

Charakterisierung atherosklerotischer Plaque-Ablagerungen
mittels FTIR- und Raman-Mikrospektroskopie

Dissertation
zur Erlangung des akademischen Grades

doctor medicinae (Dr. med.)

vorgelegt dem Rat der Medizinischen Fakultät der
Friedrich-Schiller-Universität Jena

von Annika Lattermann

geboren am 24.11.1986 in Neuhaus am Rennweg

Gutachter:

1. **Prof. Dr. Bernhard R. Brehm**, Katholisches Klinikum Koblenz
2. **Prof. Dr. Jürgen Popp**, Leibniz-Institut für Photonische Technologien Jena
3. **Prof. Dr. Andreas Hansch**, Heinrich-Braun-Klinikum Zwickau

Tag der öffentlichen Verteidigung: 02. September 2014

Meinen Eltern in Dankbarkeit gewidmet

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

°C	Grad Celsius, Einheit der Temperatur
μ	micro-
Abb.	Abbildung
Aqua dest.	destilliertes Wasser
bez.	bezüglich
bzw.	beziehungsweise
C	Cholesterin
CaF ₂	Kalziumfluorid
CE	Cholesterinester
cm ⁻¹	inverse Zentimeter, Einheit der Wellenzahl
CCD	engl. <i>charge coupled device</i>
CTA	computertomographische-Angiographie
DDE	engl. <i>dynamic data exchange</i>
EvG	Elastica-van-Gieson
FPA	engl. <i>focal plane array</i>
FTIR	Fourier-Transform-Infrarot
g	Gramm, Einheit der Masse
gr.	griechisch
HES	Hydroxyethylstärke
HCA	Hierarchische Cluster-Analyse
HDL	engl. <i>high density lipoprotein</i>
HE	Hämatoxylin-Eosin

IMR	Intima-Media-Ratio
INF- γ	Interferon- γ
IPHT	Institut für Photonische Technologien
i. R.	im Rahmen
IR	Infrarot
IVUS	intravasaler Ultraschall
k	kilo-
KG	Körpergewicht
l	Liter, Einheit für Volumen
LDL	engl. <i>low density lipoprotein</i>
LEI	Lamina elastic interna
LPR	Lipid-Protein-Ratio
m	milli-
mmHg	Millimeter Quecksilbersäule, Einheit des Druckes
min	Minute, Einheit der Zeit
Mio	Million
MIR	mittleres Infrarot
MRA	Magnetresonanz-Angiographie
n	nano-
NA	Numerische Apertur
NaCl	Natriumchlorid
NZW	engl. <i>New Zealand White</i>
OCT	optische Kohärenz-Tomographie

oxLDL	oxidiertes LDL
P	Protein
PBS	engl. <i>phosphate buffered saline</i>
PL	Phospholipide
RF-IVUS	Radiofrequenz-basierter intravasaler Ultraschall
s	Sekunde
SS	Sommersemester
TG	Triglyzeride
TLLV	Thüringer Landesamt für Lebensmittel und Verbraucherschutz
UKD	Universitätsklinikum Dresden
UKJ	Universitätsklinikum Jena
URL	engl. <i>uniform resource locator</i>
VCA	Vertex-Komponenten-Analyse
W	Watt, Einheit für Leistung
WHO	engl. <i>World Health Organisation</i>
WS	Wintersemester
z. B.	zum Beispiel
z. T.	zum Teil

1 ZUSAMMENFASSUNG	1
2 EINLEITUNG	3
2.1. Atherosklerose	3
2.1.1 Atherosklerotische Läsionen	3
2.1.2 Endotheliale Dysfunktion	5
2.1.3 Charakterisierung der Gefäßwandmorphologie	6
2.2 Schwingungsspektroskopie	9
2.2.1 Infrarot-Spektroskopie	9
2.2.2 Raman-Spektroskopie	11
2.2.3 Stand der Forschung	12
4 METHODIK	16
4.1 Versuchstiere und Tierhaltung	16
4.2. Interventionsabläufe	17
4.2.1 Gefäßentnahme / Probengewinnung	17
4.2.2 Narkose	17
4.2.3 Perfusionsfixierung der Gefäße	17
4.2.4 Präparation und Entnahme der Gefäße	18
4.2.5 Detektion lipidhaltiger Aortenabschnitte	18
4.3 Histologische Gefäßpräparate	19
4.3.1 Herstellung von Kryostatpräparaten	19
4.3.2 Herstellung von Paraffinpräparaten	19
4.3.3 Hämatoxylin-Eosin-Färbung	20
4.3.4 Elastica van Gieson-Färbung	20
4.3.5 Sudanschwarz-Färbung	21
4.4 Morphometrie	22
4.4.1 Geräte und Software	22
4.4.2 Plaquefläche	22
4.4.3 Intima-Media-Verhältnis	22
4.5 FTIR-Mikroskopie	23
4.5.1 Geräte und Software	23
4.5.2 Datenbearbeitung / Bildanalyse der IR-Daten	23
4.6 Raman- Mikroskopie	25
4.6.1 Geräte und Software	25
4.6.2 Datenbearbeitung /Bildanalyse der Raman-Daten	26
4.7 Statistische Auswertung	28

5	ERGEBNISSE	29
5.1	Referenzspektren	29
5.2	Mikrospektroskopien	31
5.2.1	FTIR-Mikroskopie	31
5.2.2	Raman-Mikroskopie	35
5.3	Morphometrie	38
6	DISKUSSION	40
6.1	Tiermodell	40
6.2	Interpretation der Ergebnisse	41
6.2.1	FTIR-Mikrospektroskopie	42
6.2.2	Raman-Mikrospektroskopie	45
6.3	Morphometrie	50
6.4	Ausblick	51
7	SCHLUSSFOLGERUNGEN	53
8	LITERATURVERZEICHNIS	55
9	ANHANG	63
9.1	Abbildungsverzeichnis	63
9.2	Publikationen/ Kongressbeiträge	64
9.3	Danksagung	65
9.4	Ehrenwörtliche Erklärung	66

1 ZUSAMMENFASSUNG

Atherosklerotisch bedingte Erkrankungen des Herz-Kreislauf-Systems stellen die Haupttodesursachen in den westlichen Industrienationen dar (Glass et al. 2001). Mit der Ausbildung vulnerabler Plaqueformationen ist eine Tendenz zu Plaquerupturen mit Abgabe von embolischem Material ins Gefäßsystem festzustellen, wodurch distale Gefäßabschnitte komplett verschlossen werden können. Myokardinfarkte sowie zerebrale Ischämien stellen häufige Komplikationen dar (Naghavi et al. 2003b). Atherosklerotische Plaques bestehen hauptsächlich aus Lipidablagerungen mit Cholesterinestern, Cholesterin, Phospholipiden und Triglyzeriden, Komponenten der extrazellulären Bindegewebmatrix sowie Zellen der glatten Muskulatur und des Immunsystems (Stary et al. 1994). Histopathologische Untersuchungen zeigen, dass die Zusammensetzung je nach Plaque-Art sehr unterschiedlich sein kann (Stary et al. 1994). Anhand histologischer Präparate ist eine Stadieneinteilung atherosklerotischer Läsionen möglich. Eine Strukturanalyse mit Erfassung der molekularen Plaque-Zusammensetzung kann hiermit allerdings nicht realisiert werden. Schwingungsspektroskopische Analyseverfahren, wie die Infrarot- (IR-) und Raman-Spektroskopie, scheinen hierfür besonders geeignet (Nogueira et al. 2005) und ermöglichen Mikroskopie-gekoppelt eine genaue molekulare Charakterisierung und Strukturaufklärung biologischer Proben. Die hierbei zugrunde liegenden physikalischen Phänomene basieren auf der Anregung intramolekularer Schwingungen, zum einen durch Absorption von Infrarotstrahlung (IR-Spektroskopie), zum anderen durch inelastische Streueffekte eingesetzter Laserstrahlung (Raman-Spektroskopie).

Ziel der vorliegenden Arbeit ist eine genaue biochemische Charakterisierung und Strukturaufklärung atherosklerotisch veränderter Gefäßquerschnitte mithilfe der Mikroskop-gekoppelten Fourier-Transform-Infrarot- und Raman-Spektroskopie. Neben der qualitativen Auswertung sollen ebenfalls quantitative Analysen der unterschiedlichen Komponenten durchgeführt und anhand der entsprechenden Histomorphologien vergleichend gegenübergestellt werden. Fünf männliche adulte *New Zealand White*-Kaninchen wurden über einen Zeitraum von neun Wochen einer 0,5%igen cholesterinreichen Diät unterzogen. Lipidreiche Areale der entnommenen Kaninchen-Aorten wurden spektroskopisch detektiert (Matthäus et al. 2012a) und

entsprechende Kryostatpräparate hergestellt. Für die IR-Spektroskopie wurde ein 670er Model von Agilent (Santa Clara, USA), für die Raman-Mikroskopie ein 300-alpha-Plus Model von WITec (Ulm, Deutschland) genutzt. Neben Übersichtsaufnahmen, welche den kompletten Gefäßquerschnitt abdecken, wurden ebenfalls mit beiden Spektroskopie-Verfahren lipidreiche Areale innerhalb der Plaques auf ihre Zusammensetzung hin genauer untersucht. Anhand der erhaltenen Spektralinformationen konnten computergestützt multivariate Datenanalysen, wie die Hierarchische Cluster-Analyse (HCA) und die Vertex-Komponenten-Analyse (VCA) durchgeführt und als Falsch-Farbenbilder dargestellt werden. Zur Kontrolle der spektroskopisch generierten Bilder dienten Hämatoxylin-Eosin-, Elastica van Gieson- und Sudanschwarz-gefärbte Parallelschnitte. Morphometrisch wurden die Plaquefläche und die Intima-Media-Ratio (IMR) jedes Gefäßquerschnittes bestimmt. Analog hierzu konnte anhand der spektroskopisch generierten Daten eine Lipid-Protein-Ratio (LPR) erstellt werden.

IR-spektroskopisch ließen sich lipid- und proteinhaltige Komponenten klar voneinander abgrenzen. Lipide zeigten sich hauptsächlich intimal, Proteinfractionen konnten hier nur strukturgebend, in der Media aber als Hauptbestandteil dargestellt werden. Die generierten LPRs fielen aufgrund der in die Bewertung mit einbezogenen intimalen Bindegewebsmatrix erwartungsgemäß geringer aus als die entsprechenden IMRs. Eine Differenzierung unterschiedlicher Lipidfraktionen gelang IR-spektroskopisch nicht. Cholesterinester wurden hier als Hauptlipidkomponente bestimmt. Durch Nebeneinanderstellung der VCA- und HCA-Bilder zeigten sich ähnliche Lipid- und Proteinverteilungsmuster, wobei im Rahmen der HCA Mischkomponenten dargestellt werden konnten. Die spektroskopisch detektierten Lipide hielten dem Vergleich mit den entsprechenden Lipidfärbungen stand. Raman-spektroskopisch gelang aufgrund der besseren spektralen und lateralen Auflösung neben der Detektion von Cholesterinestern auch die Darstellung von Cholesterin und Phospholipiden / Triglyzeriden. Morphologisch konnten diese Komponenten hier detaillierter dargestellt werden, sodass neben den bereits IR-spektroskopisch detektierten Schaumzellen auch Cholesterinkristalle und das bindegewebige Gerüst sichtbar wurden. Die Mikrospektroskopie stellt eine potentielle Methode zur Detektion und Differenzierung molekularer Gewebeveränderungen dar. Besonders die Raman-Spektroskopie in Kombination mit katheterbasierten visuellen Techniken könnte die *in-vivo*-Detektion von instabilen Plaques weitreichend verbessern.

2 EINLEITUNG

2.1. ATHEROSKLEROSE

Kardiovaskuläre Erkrankungen stellen die Haupttodesursache in der westlichen Zivilisation dar (Naghavi et al. 2003b). Die für Deutschland erstellte Todesursachenstatistik von 2011 zeigt Herz-Kreislauf-Erkrankungen mit 40,15% an führender Stelle. Neben der chronisch ischämischen Herzkrankheit und dem akuten Myokardinfarkt fallen auch die Herzinsuffizienz und der apoplektische Insult in die Kategorie der Herzkreislauserkrankungen (Glass & Witztum 2001). Die Atherosklerose, als Hauptrisikofaktor dieser Erkrankungen, stellt einen typischen Alterungsprozess der arteriellen Gefäßwand dar und wird vor allem durch das Vorliegen eines ungesunden Lebensstils getriggert. Neben einer fett- und kohlenhydratreichen Ernährung, mangelhafter körperlicher Betätigung und Nikotinabusus sind häufig daraus hervorgehenden Erkrankungen wie eine arterielle Hypertonie, Diabetes mellitus, Lipidstoffwechselstörungen und Adipositas zu nennen.

2.1.1 ATHEROSKLEROTISCHE LÄSIONEN

Der allgemein bekannte und primär geprägte Begriff einer Arteriosklerose (gr. *arteria* = ‚Schlagader‘; gr. *skler-* = ‚hart‘; gr. *-ose* = ‚krankhafter Zustand‘) steht bezeichnend für die Gesamtheit aller Veränderungen von Arterien, welche aufgrund von narbig fibrotischen und kalzinotischen Gefäßumwandlungen mit einer Verhärtung assoziiert sind. Anhand fortschreitender Erkenntnisse bezüglich der Zusammensetzung von arteriellen Gefäßwandablagerungen wurde der Begriff der Atherosklerose (gr. *athere* = ‚Mehlbrei‘) geprägt, welcher den begleitenden bzw. oftmals auslösenden Lipidablagerungen der Intima Rechnung trägt (Schaefer H.-E. 2007, Biller K. und de Lourdes Stiegeler M., Hrsg. 2008). Entsprechend der Weltgesundheitsorganisation (WHO) wird die Atherosklerose als variable Kombination von Intimaveränderungen, bestehend aus herdförmigen Ansammlungen von Lipiden, komplexen Kohlenhydraten, Blut und Blutbestandteilen, Bindegewebe und Kalziumablagerungen, verbunden mit Veränderungen der Arterienmedia definiert. Die Bildung atherosklerotischer Plaqueformationen geht mit einem chronisch entzündlichen Prozess der arteriellen Gefäßwand einher, welcher von der

Gefäßintima auf den ihr anliegenden Bereich der Media übergreift (Libby et al. 2009). Das Auftreten von herdförmigen Lipidformationen und die diffuse Anhäufung von kollagenem Fasermaterial prägen hierbei den Begriff der Atherosklerose (Stary et al. 1994). Atherosklerotische Gefäßwandveränderungen zeichnen sich durch fokale asymmetrische Verdickungen der Intima aus, welche primär durch progressive Lipideinlagerungen generiert und, basierend auf entzündlichen und thrombotischen Prozessen, verkompliziert werden (Hansson 2005). Aufgrund der zunehmenden Lumenobstruktion und Blutflussverminderung ist ab einem Stenierungsgrad von ca. 70% mit ersten klinischen Symptomen zu rechnen, welche aus der Ischämie im betroffenen Gewebeareal resultieren (Naghavi et al. 2003b).

Initiärläsionen (Typ-I-Läsionen), mit Ansammlungen von einzelnen Makro- und Lipophagen, zeigen sich bereits in den ersten Lebensjahren (Stary et al. 1994). Die Ausbildung von Fettstreifen (Typ-II-Läsionen), welche noch vollständig reversibel sind, geht mit intrazellulären Lipidanreicherungen und einer Myofibroblastenproliferation einher. Im Verlauf entwickeln sich aus diesen sogenannten „*fatty streaks*“ Intermediärläsionen (Typ-III-Läsionen). Diese besitzen bereits kleine extrazelluläre Lipidablagerungen, welche die Vorstufe von Atheromen bilden und in der Regel erst mit der dritten Lebensdekade auftreten (Stary et al. 1995). Progressive Intermediärläsionen mit großen extrazellulären Lipidablagerungen weisen bereits einen Lipidkern auf und sind somit charakteristisch für Atherome (Typ-IV-Läsionen). Bedingt durch proliferierende Myofibroblasten und die Anhäufung von Kollagen entstehen Fibroatherome (Typ-V-Läsion). Der vorhandene Lipidkern derer ist zum Gefäßlumen hin mit einer fibrösen Kappe abgedeckt, welche aus glatten Muskelzellen und einer kollagenreichen Matrix besteht (Glass & Witztum 2001). Im weiteren Verlauf können sich neben verkalkenden und sklerosierenden zellarmen Läsionen auch komplizierte Verläufe entwickeln. Zahlreich eingewanderte aktivierte Makrophagen, T-Zellen und Mastzellen, welche sich vor allem im Randbereich der an Größe zunehmenden Läsion finden, produzieren inflammatorische Zytokine, Proteasen, Radikale, Koagulations- und vasoaktive Faktoren (Glass & Witztum 2001). Diese tragen letztendlich zur Destabilisierung der fibrösen Deckschicht bei. Eine hieraus resultierende Plauefissur mit nachfolgender Ruptur führt zu einer zur Abgabe von embolischen Material in das nachgeschaltete Gefäßsystem und zum anderen zur Aktivierung der Gerinnungskaskade mit Ausbildung eines Thrombus,

wodurch der betroffene Gefäßabschnitt verengt bzw. verschlossen wird (Libby et al. 2009).

Unter den in atherosklerotischen Läsionen vorhandenen Lipiden treten Cholesterol mit 10 - 30% und Cholesterolester mit einer Häufigkeit von 45 - 78% auf (Weinmann et al. 1998).

2.1.2 ENDOTHELIALE DYSFUNKTION

Die Pathogenese der Atherosklerose ist noch nicht vollständig verstanden, jedoch scheint nach aktueller Kenntnislage eine Dysfunktion bzw. Läsion des Gefäßendothels am Anfang der Atherogenese zu stehen. Entsprechend der *Response-to-Injury*-Hypothese kommt es durch Schäden am Endothel zur gesteigerten Permeabilität von Plasmabestandteilen und zur Adhäsion von Mono- und Thrombozyten (Sun et al. 2000). Entsprechend atherogen wirkt sich eine bestehende arterielle Hypertonie auf die Gefäßwand aus. Atherosklerotische Veränderungen treten somit besonders häufig an Stellen hoher mechanischer Belastung auf, wie sie an Gefäßabzweigungen und -biegungen zu finden sind.

Eine gesteigerte Endothelpermeabilität verursacht einen verstärkten Einstrom von im Blut befindlichen Lipoproteinen, wobei hier vor allem Low-Density-Lipoproteine (LDL) auf passivem Weg die Endothelschranke überwinden und so in die Intima eintreten (Steinberg et al. 1999). Die Rückführung des LDL-Cholesterinanteils ins Blut und der Weitertransport zur Leber mit dortiger Metabolisierung werden mithilfe von High-Density-Lipoproteinen (HDL) ermöglicht, welche entsprechend gefäßprotektive Eigenschaften besitzen (Hafiane et al. 2013). Eine Anreicherung der verschiedenen Lipoprotein-Fraktionen ist proportional zu den im Blut vorzufindenden Konzentrationen zu betrachten, sodass sich die intimale Verweildauer von LDL mit einem geringen LDL-HDL-Quotienten verkürzt. Bei hohen intimalen LDL-Konzentrationen kommt es durch Kontakt mit reaktiven Sauerstoffradikalen der Endothelzellen und der zu Makrophagen differenzierten Monozyten zur Bildung von oxidiertem LDL (oxLDL) (Hansson 2005). HDL verfügt als weiteren atheroprotektiven Mechanismus eine Lipoxygenase-hemmende Untereinheit und ist somit in der Lage die Entstehung von oxLDL zu vermindern. Über die Akkumulation von oxLDL produzieren Endothelzellen verstärkt Chemokine. Sie fördern somit neben der

Adhäsion und Migration von T-Lymphozyten und Monozyten deren Umwandlung zu Makrophagen. OxLDL wird endozytotisch über Scavenger-Rezeptoren der Makrophagen aufgenommen und enzymatisch umgewandelt (Hafiane & Genest 2013; Hansson 2009). Die hieraus resultierenden vakuolären Cholesterinester-Einlagerungen sind charakteristisch für das Erscheinungsbild der Lipophagen, den sogenannten Schaumzellen (Rosenfeld et al. 1991). Ansammlungen dieser führen bereits in frühen Stadien der Atherogenese zu hellen, streifig erhabenen makroskopischen Veränderungen der Arterieninnenseite (Sary et al. 1995). Eine fehlende enzymatische Verdauung der Cholesterinester durch die Schaumzellen bedingt letztendlich das Auskristallisieren des Cholesterins (Preston Mason et al. 2003). CD4⁺ T-Zellen tragen mit der Bildung apoptoseauslösender Perforine zum Schaumzelluntergang und letztendlich zur Bildung des Atheroms bei (Li 2013). Der hier vorliegende Lipidkern entspricht einem bei Körpertemperatur flüssigen Fettbrei und stellt somit eine mechanisch instabile Plaque dar (Naghavi et al. 2003a). Diese intimalen Veränderungen führen zu Interaktionen zwischen T-Lymphozyten und Makrophagen, welche im Folgenden die Migration und Proliferation von Mediamyozyten fördern und gleichzeitig die kontraktilen Fähigkeiten der Gefäßwand herabsetzen (Glass & Witztum 2001). Das im Rahmen der Entzündungsreaktion ausgeschüttete IFN- γ wirkt sich hemmend auf die Produktion von Matrixproteinen und dementsprechend destabilisierend auf die Plaque aus. Ebenfalls eine destabilisierende Wirkung zeigen von Makrophagen produzierte Proteinasen (Hansson 2005). Kollagenfaserreiche Plaques und solche mit Kalziumphosphatablagerungen stellen mechanisch stabile Plaques dar, welche den Gefäßabschnitt häufig stark stenosieren und somit beispielsweise pektanginöse Beschwerden hervorrufen.

2.1.3 CHARAKTERISIERUNG DER GEFÄßWANDMORPHOLOGIE

Die Atherogenese entspricht einem schleichenden Prozess, welcher sich häufig erst nach Jahrzehnten klinisch bemerkbar macht. Frühzeitig diagnostizierte atherosklerotisch veränderte Gefäßinnenwände und deren genaue Morphologie helfen, die Komplikationsrate besser abschätzen und therapeutisch angemessen handeln zu können. Eine sichere Differenzierung zwischen instabilen und stabilen

Plaques bzw. deren Tendenz ist hierbei obligat. Neben einem geringen Lumen und einer stenosierenden Plaqueläche von $\geq 90\%$ spielt bei der Instabilitätseinschätzung ebenfalls das Vorhandensein einer fibrösen Deckplatte eine wichtige Rolle (Naghavi et al. 2003b).

Sonographisch besteht nicht-invasiv die Möglichkeit größere, von außen zugängliche Gefäße auf stenosierende Prozesse hin zu beurteilen. Der Ultraschall wird hierbei an unterschiedlichen Gewebestrukturen verschieden stark reflektiert, sodass Dichteunterschiede detektiert werden können und der Untersucher Hinweise auf die Stabilität der vorliegenden Plaque erhält. Mithilfe der farbkodierten Duplex-Sonographie besteht weiterhin die Möglichkeit den intravasalen Fluss darzustellen. Ebenfalls kann die Flussgeschwindigkeit bestimmt und Turbulenzen bei vorliegenden Stenosen demaskiert werden. Aussagen bezüglich der Plaque-Vulnerabilität können hiermit nicht sicher getroffen werden. Eine Beurteilung der Koronarien und der intrakraniellen Gefäße beim Erwachsenen sind ebenfalls nicht möglich. Weitere nicht-invasive Möglichkeiten der bildgebenden Diagnostik stellen die computertomographische-Angiographie (CTA) und die Magnetresonanz-Angiographie (MRA) dar. Zur Kontrastierung der Gefäße gegenüber dem umliegenden Gewebe wird bei der CTA und zum Teil auch bei der MRA die Injektion von Kontrastmittel notwendig. Eine frei rotierbare Darstellung der entsprechenden Gefäße ist hiermit möglich. Neben der Detektion von stenosierten Gefäßabschnitten kann mittels MRA ebenfalls eine entsprechende Minderperfusion im umliegenden Gewebe sichtbar gemacht werden. Im Rahmen minimal-invasiver Katheter-Untersuchungen werden die betreffenden Gefäßareale mittels lokal injizierten Kontrastmittels angiographisch dargestellt. Eine gleichzeitige therapeutische Beseitigung der Stenosen ist ebenfalls möglich. Bei der Katheter-Untersuchung gewähren die Verwendung des intravasalen Ultraschalls (IVUS) oder der optischen Kohärenztomographie (OCT) genauere Einblicke in die Gefäßwandmorphologie. Beim IVUS kommen hochfrequente Schallsonden zum Einsatz, welche radiologisch gesteuert platziert werden und ein 360°-Bild des Gefäßquerschnittes erzeugen. Eine axiale Auflösung von ca. 100 - 200 μm (Bertrand und King 2009) zeigt auch hier der Methode ihre Grenzen auf, sodass zwar Ausmaß und Verteilung der vorhandenen Plaques bestimmt werden können, eine qualitative Analyse allerdings nur bedingt möglich ist. Verschiedenartige echodichte Ultraschallsignale werden hierbei zur Interpretation genutzt (Huisman et al. 2011). Erweiterte Aussagen zu vorhandenen

Plauekonomieenten sind mittels Radiofrequenzanalysen (RF-IVUS) der eingegangenen Echosignale möglich und können als „virtuelle Histologie“ mittels Falschfarbenbildern dargestellt werden (Gogas et al. 2011). Der RF-IVUS konnte aufgrund verschiedener technischer Limitationen bisher ausschließlich experimentell eingesetzt werden. Spezielle Parameter für besonders risikobehaftete Läsionen, wie das Ausmaß der fibrotischen Kappe, können anhand des IVUS nicht aussagekräftig beurteilt werden. Auch ist eine konkrete Unterscheidung von echoarmen lipidreichen Plauestrukturen und ebenfalls echoarmen Thrombusmaterial aktuell nicht möglich. Eine weitere Einschränkung stellen Lipidansammlungen dar, welche sich hinter kalzifizierten Strukturen befinden. Diese sind aufgrund deren Echodichte und der daran gebundenen dorsalen Schallauslöschung für den Untersucher unsichtbar (García-García et al. 2011; Gogas et al. 2011). Im Vergleich dazu bietet die OCT, welche Licht einer geringen Kohärenzlänge nutzt, eine Eindringtiefe von bis zu 3 mm. Die axiale Auflösung bewegt sich im Bereich von 1 - 15 µm, wobei hohe Messgeschwindigkeiten erreicht werden können (Drexler et al. 2001). Aufgrund der guten axialen Auflösung sind eine genaue Ausmessung von fibrotischen Kappen und somit die Detektion rupturgefährdeter instabiler Plaques möglich. Weiterhin besteht hiermit eine gute Kontrollmöglichkeit bereits durchgeführter Interventionen. Auch In-Stent-Restenosen können hiermit detektiert werden (Huisman et al. 2011). Eine konkrete Strukturanalyse mit Beurteilung der chemischen Zusammensetzung der atherosklerotischen Plaques lässt sich hiermit allerdings nicht durchführen.

Zur mikroskopischen Beurteilung von atherosklerotischen Gefäßquerschnitten werden neben Hämatoxylin-Eosin-Übersichtsfärbungen (HE) ebenfalls Elastica-van-Gieson-Färbungen (EvG), welche eine bessere Differenzierung von Intima und Media zulassen, aber auch histochemische Fettfärbungen mit Sudanswarz oder Ölrot durchgeführt. Anhand der beschriebenen Fettfärbungen ist keine Unterscheidung verschiedener Lipide gegeben.

2.2 SCHWINGUNGSSPEKTROSKOPIE

Die Schwingungsspektroskopie wird als Teilbereich der Molekülspektroskopie angesehen, da mit diesem analytischen Verfahren Normalschwingungen von Molekülen angeregt werden können. Molekülspezifisch ist es hier möglich, entsprechende Schwingungsmuster und -frequenzen zu detektieren, welche Rückschlüsse auf vorhandene funktionelle Gruppen zulassen. So sind mit den Methoden der Schwingungsspektroskopie auch Strukturanalysen möglich, womit die chemische Zusammensetzung und Struktur unterschiedlichster Materialien und Gewebeproben beurteilt werden können und vergleichbar mit einem chemischen Fingerabdruck zu sehen sind. Zur Strukturanalyse eignen sich besonders die Infrarot- (IR-) und Raman-Spektroskopie (Manoharan et al. 1993; Matthäus et al. 2012a; Nogueira et al. 2005). Sie liefern von den molekülspektroskopischen Methoden, neben der Massenspektroskopie, den breitesten Informationsgehalt, da aufgrund der Vielzahl an gleichzeitig angeregten Biomolekülen entsprechend viele Banden in den Schwingungsspektren aufgelöst werden können. Pathologische Veränderungen im Gewebe, den Zellen oder auch Organellen zeichnen sich durch eine Veränderung in deren Struktur und molekularen Zusammensetzung aus. Diese Gewebeveränderungen zeigen sich ebenfalls in Form von veränderten Schwingungsspektren (Beleites et al. 2011; Krafft et al. 2009), welche somit auf ein entsprechendes Krankheitsgeschehen hinweisen können. Die Kombination von klassisch-analytischen Spektroskopiemethoden mit der konventionellen Mikroskopie erlaubt eine genaue Charakterisierung der molekularen Zusammensetzung, strukturellen Anordnung von biologischem Gewebe (Buschman et al. 2001b; Lattermann et al. 2013) und stellt somit eine wichtige Ergänzung zu herkömmlichen histopathologischen Untersuchungen dar.

2.2.1 INFRAROT-SPEKTROSKOPIE

Einem Teilgebiet der Schwingungsspektroskopie entspricht die IR-Spektroskopie, welche durch Absorption von Infrarot-Strahlung im mittleren infraroten (MIR) Spektralbereich von $400 - 4000 \text{ cm}^{-1}$ intramolekulare Schwingungen anregt. Molekülschwingungen können hiermit nur dann detektiert werden, wenn die vorliegenden Verbindungen IR-aktiv sind, also ein induzierbares bzw. veränderbares

Dipolmoment besitzen. Schwingungen, welche sich symmetrisch zum Symmetriezentrum verhalten, sind IR-inaktiv und können mittels IR-Spektroskopie in der Regel nicht nachgewiesen werden. Diese Schwingungen sind meist Raman-aktiv und eine Detektion ist mithilfe der Raman-Spektroskopie möglich. Beide Methoden sind nicht als identisch zu betrachten, sondern ergänzen sich. Heutzutage werden IR-spektroskopische Messungen hauptsächlich mittels Fourier-Transform-Infrarot-(FTIR-)Spektrometern durchgeführt, da sich durch deren Verwendung kürzere Messzeiten ergeben und ein höheres Signal-Rausch-Verhältnis hergestellt werden kann. Die kurzen Messzeiten ermöglichen ebenfalls eine zeiteffizientere Analyse der Probe mit spektrometergekoppelten Mikroskopen, sodass nach Abscannen derer die Materialverteilung analysiert werden kann.

Gewebeproben sind besonders wasserhaltig und zeigen in Interaktion mit MIR-Strahlung eine starke Absorption von Wasser, weshalb sich hier nur geringe Eindringtiefen von wenigen Mikrometern realisieren lassen. Histologische Präparate müssen zudem eine Schichtdicke zwischen 5 bis maximal 20 μm aufweisen, da dickere Schichten zu stark absorbieren.

Der FTIR-mikrospektroskopische Aufbau beinhaltet eine Strahlungsquelle, das Interferometer, ein Mikroskop und einen für MIR sensiblen Detektor (siehe Abb. 1). Das abgegebene Licht der Strahlungsquelle wird von einem Strahlteiler in zwei Strahlen zerlegt. Einer davon wird auf einen mobilen, der andere auf einen immobilen nachgeschalteten Spiegel übertragen. Anhand dieser Einsätze können die Strahlen reflektiert werden und durchlaufen nun ein weiteres Mal den Strahlteiler. Die im Folgenden interferierenden Strahlen werden abermals über installierte Spiegel auf ein reflektierendes Cassegrain-Spiegel-Linsen-Objektiv gelenkt. Im Rahmen von Transmissions-Messungen wird das einfallende Licht auf die Probe gebündelt und durchdringt diese im Folgenden. Über den Cassegrain-Kondensor und einen nachgeschalteten Spiegel wird die durch die Probe nicht absorbierte Strahlung zum Detektor gelenkt. Zur Eingrenzung des Probenbereiches und zur Vermeidung von beugungsbedingten Fehlern in den Spektren sind Aperturen vorhanden. Aufgrund der IR-intransparenten herkömmlichen Lichtmikroskop-Objektive kommen hier reflektierende Cassegrain-Objektive zum Einsatz. Ebenfalls müssen IR-durchlässige Objektträger genutzt werden. FTIR-bildgebend wird ein Focal-Plane-Array-(FPA-) Detektor genutzt, welcher in der Regel aus 64 x 64 kleinen Detektorelementen

besteht. Aufgrund der Wellenlängen-abhängigen Ortsauflösung liegt diese hier unter optimalen Bedingungen bei ca. 10 μm , was einen Schätzwert für den MIR-Bereich darstellt.

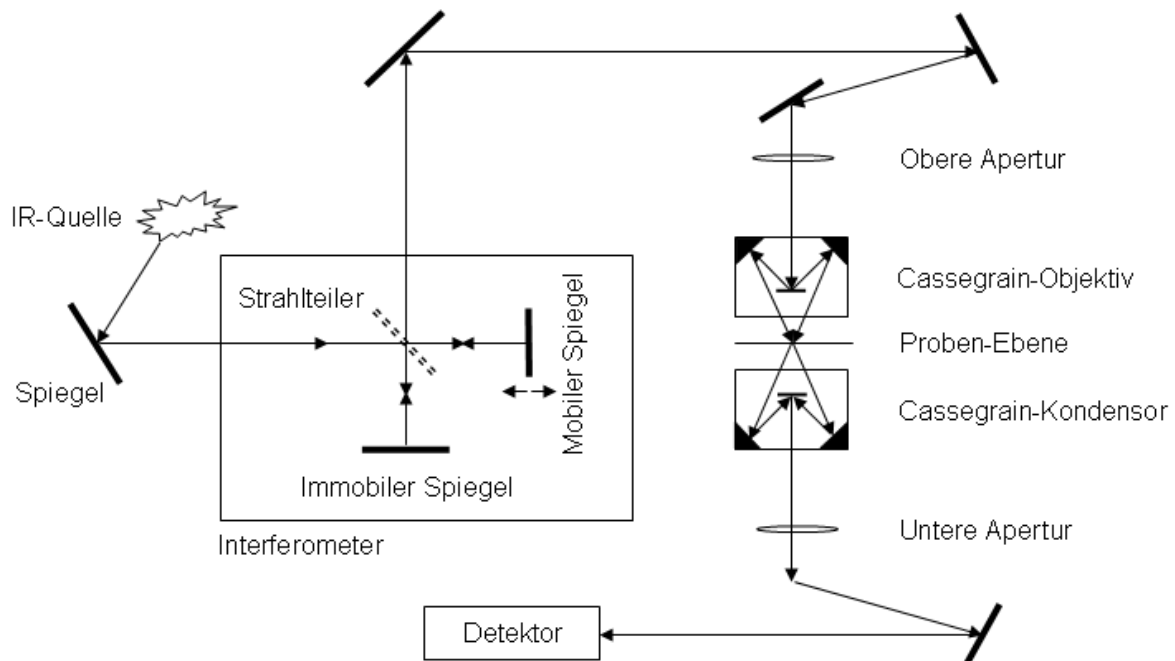


Abb. 1 Schematische Darstellung eines Mikroskop-gekoppelten FTIR-Spektrometers.
Adaptiert von Smith G. D. 2003

2.2.2 RAMAN-SPEKTROSKOPIE

Die Raman-Spektroskopie ist ebenfalls als Teilgebiet in die Schwingungsspektroskopie einzugliedern. Intramolekulare Schwingungen werden hierbei durch inelastische Streuung von monochromatischem Licht eines Lasers ausgelöst. Der sogenannte Raman-Effekt beschreibt die Wechselwirkung von Licht mit Materie. Eine Wellenlängenverschiebung der Anregungsstrahlung gegenüber dem gestreuten Licht resultiert aus dieser Energieübertragung und wird als Raman-Verschiebung bezeichnet. Die Energie der hierbei angeregten Schwingungsprozesse ist charakteristisch und entspricht den Frequenzunterschieden zum eingestrahlt Licht. Mithilfe der Spektren sind dadurch Rückschlüsse auf die zugrunde liegenden Substanzen möglich. Anders als bei der Infrarot-Spektroskopie kommt hier keine

kontinuierliche Strahlungsquelle, sondern ein monochromatischer Laserstrahl zum Einsatz. Dieser wird über einen Strahlteiler gelenkt, welcher Licht mit genau der Wellenlänge des Lasers reflektiert und über eine Optik auf die Probe fokussiert. Im rückgestreuten Licht erfolgt über eben jenen Strahlteiler die Entfernung der Rayleigh-Strahlung. Einzelspektren werden im Folgenden auf einer CCD-Kamera abgebildet und die Intensitäten abhängig von der Wellenlänge gemessen. Anschließend erfolgt die Übertragung der Daten zur Berechnung und Weiterverarbeitung auf einen Computer (siehe Abb.2).

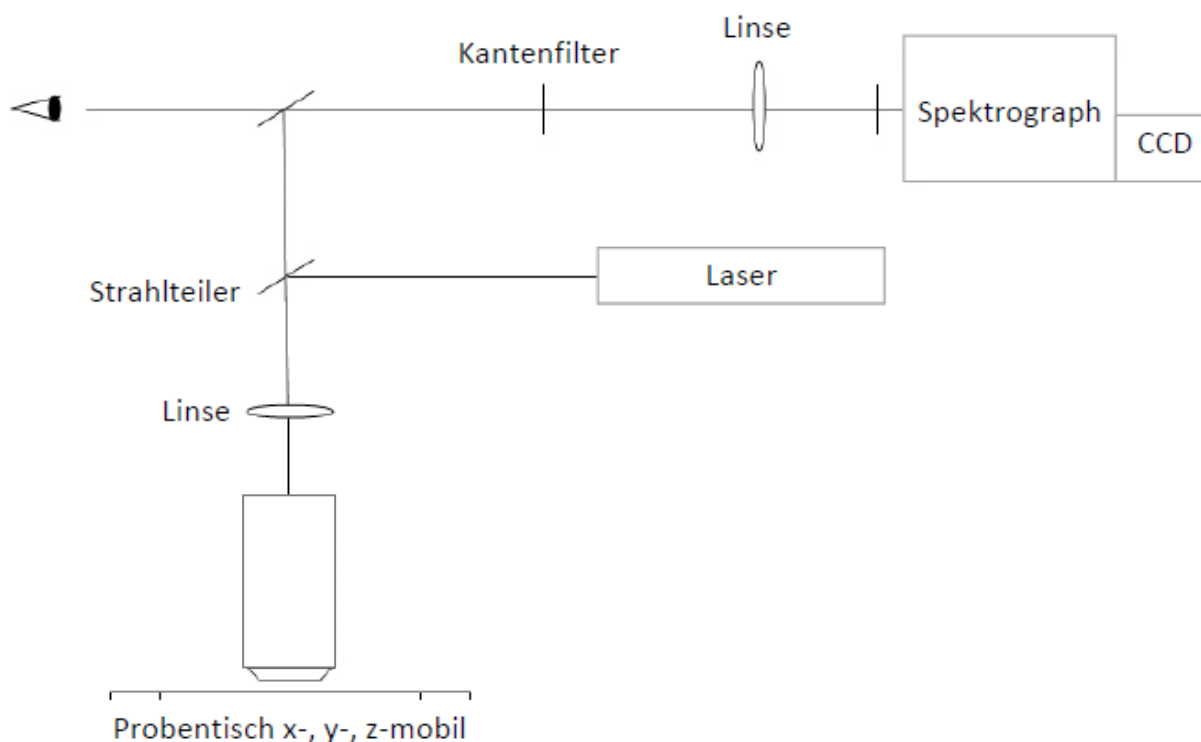


Abb. 2 Schematischer Aufbau eines Raman-Spektrometer-gekoppelten Mikroskops.

Mit freundlicher Genehmigung von Dr. C. Matthäus, IPHT Jena

2.2.3 STAND DER FORSCHUNG

Durchgeführte Studien im Rahmen der Atherosklerose-Forschung haben gezeigt, dass die Vulnerabilität von Plaques und die damit verbundene Komplikationsrate in Abhängigkeit ihrer Zusammensetzung und Morphologie zu sehen sind (Libby et al. 1998). Verschiedene invasive und nicht-invasive Techniken stehen aktuell zur Detektion von Hochrisiko-Läsionen zur Verfügung oder befinden sich im

Entwicklungsprozess (Schaar et al. 2007; Tosi et al. 2012). Neben den bereits im klinischen Alltag eingesetzten diagnostischen Verfahren erscheinen schwingungsspektroskopische Methoden, wie die Raman- oder Infrarot-Spektroskopie, besonders vielversprechend. Hiermit können Gewebeveränderungen anhand der generierten spektroskopischen Informationen klassifiziert werden (Krafft et al. 2009). Instabile Plaques anhand ihres histologischen Charakters bzw. ihrer molekularen Zusammensetzung zu erkennen ist für die Wahl der Therapieoption und den sich hieraus ergebenden Krankheitsprozess entscheidend. IR-spektroskopisch wurden atherosklerotische Gefäßwandveränderungen bisher nur vereinzelt untersucht. Entsprechende Vergleiche zwischen atherosklerotisch und nicht-atherosklerotisch veränderten Aortenabschnitten sowie verschiedene Untersuchungen zum Protein- und Lipidverteilungsverhaltens wurden nur an Plaqueausschnitten durchgeführt (Colley et al. 2004; Palombo et al. 2009; Wrobel et al. 2012). Neben der IR-Spektroskopie bekamen Raman-spektroskopische Anwendungen, speziell die Entwicklung fiberoptischer Sonden, besondere Aufmerksamkeit zugeschrieben (van de Poll et al. 2002). Mikrospektroskopisch konnten Buschmann et al. bereits 2000 verkalkte von nicht verkalkten Plaques bzw. von nicht atherosklerotisch veränderten Gefäßabschnitten unterscheiden. Mittels Raman-Spektroskopie generierte Bilder zeigen zum Teil hochdetailliert die entsprechenden Verteilungsmuster von Proteinen und Lipiden (Kochan et al. 2013; Lattermann et al. 2013). Die kohärente anti-Stokes Raman-Streuungs- (CARS-) Mikroskopie stellt eine weitere interessante spektroskopisch bildgebende Variante dar (Cicchi et al. 2013). Die Anwendung von Raman-Systemen im Sondenformat wurde häufig *ex-vivo* (van de Poll et al. 2003), seltener jedoch *in-vivo* (Matthäus et al. 2012b; Sćepanović et al. 2011) erprobt. Bisher konnten hiermit einzig Spektren der Gefäßinnenwand und ohne eine entsprechende Bildgebung generiert werden. Auch ließen die Durchmesser der verwendeten Sonden nur die spektroskopische Beurteilung größerer Gefäße, wie die der Karotiden und der Aorta

3 ZIELSTELLUNG

Atherosklerotische Plaques setzen sich im Wesentlichen aus drei Hauptbestandteilen zusammen. Hierzu gehört die zelluläre Komponente mit Monozyten, Makrophagen, glatten Muskelzellen, Fibroblasten und weiteren Leukozyten-Untergruppen. Den extrazellulären Bestandteilen sind das Kollagen, elastische Fasern und Proteoglykane zuzuordnen. Intra- und extrazelluläre Lipidablagerungen stellen hierbei die dritte Komponente dar (Sary et al. 1992; Sary et al. 1995; Sary et al. 1994). Histopathologische Untersuchungen zeigen, dass die Zusammensetzung je nach Plaque-Art sehr unterschiedlich sein kann (Glass & Witztum 2001). Beim Auftreten von atherosklerotischen Gefäßwandveränderungen zeigen sich initial einige wenige Makrophagen im subendothelialen Bereich der Intima, welche ebenfalls diskret Lipide einlagern (Sary et al. 1994). Im Progress dieser Gefäßerkrankung können sich große extrazelluläre Lipidansammlungen bilden, mit deren Größe und dem Vorhandensein einer fibrotischen Kappe die Gefahr einer Plaqueruptur deutlich ansteigt (Naghavi et al. 2003a; Naghavi et al. 2003b).

Mithilfe histopathologischer Präparate ist es möglich, eine Klassifizierung der einzelnen Läsionstypen vorzunehmen. Neben der HE-Übersichtsfärbung, kommen hierbei ebenfalls die Sudanschwarz- und die EvG-Färbung zum Einsatz. Eine konkrete Strukturanalyse mit Erfassung der molekularen Plaque-Zusammensetzung ist anhand dieser Methoden nicht möglich.

Die Detektion biochemischer Plaquebestandteile soll anhand von mikrospektroskopischen Untersuchungsmethoden durchgeführt werden und ist als Zielstellung der vorliegenden Arbeit zu sehen. Besonders schwingungsspektroskopische Analyseverfahren eignen sich für derartige Untersuchungen (Matthäus et al. 2012a). Die Kombination von klassisch-analytischen Spektroskopiemethoden mit der konventionellen Mikroskopie soll hierbei eine konkrete biochemische Charakterisierung von atherosklerotisch veränderten Gefäßwänden ermöglichen. Anhand der IR- und Raman-Mikrospektroskopie ist eine qualitative und quantitative Analyse, ohne zeitaufwändige und materialverbrauchende Aufarbeitungsprozesse der biologischen Proben vorgesehen. Neben Übersichtsaufnahmen aller Gefäßquerschnitte sollen weiterhin differenziertere Aufnahmen unterschiedlicher Plaque-Areale durchgeführt und den entsprechenden

HE-, EvG- und Sudanschwarz- gefärbten Parallelschnitten vergleichend gegenübergestellt werden. Eine Analyse der mithilfe von IR- und Raman-Spektroskopie detektierten Spektralinformationen soll anhand computergestützter Methoden der multivariaten Datenanalyse, wie der Hierarchischen Cluster-Analyse (HCA) und der Vertex-Komponenten-Analyse (VCA), durchgeführt werden. Die hiermit generierbaren Falschfarbenbilder sollen, Bezug nehmend auf die Gefäßquerschnitte, die lipid- und proteinreichen Komponenten farblich differenziert darstellen. Anhand der IR-Daten wird zusätzlich eine quantitative Analyse dieser zwei Fraktionen angestrebt, wobei eine Gegenüberstellung mit den morphometrisch ermittelten Flächenmaßen von Intima und Media favorisiert wird. Die ins Verhältnis zu setzenden Parameter ergeben die Intima-Media-Ratio (IMR) und die Lipid-Protein-Ratio (LPR), welche hierbei der Gegenüberstellung dienen. Differenziertere Aussagen bezüglich der Verteilung von vorliegenden Lipidfraktionen sollen anhand der mikrospektroskopischen Raman-Bilder getroffen werden. Zur Kontrolle der schwingungsspektroskopisch generierten Mikroskopie-Daten wird die Histomorphologie vergleichend gegenübergestellt. Die hier genutzten spektroskopischen Analyseverfahren sollen eine wertvolle Ergänzung zu herkömmlichen histopathologischen Färbungen darstellen.

Zur Visualisierung und Charakterisierung arterieller Gefäßwandablagerungen wurden bereits erste Voruntersuchungen durch Matthäus et al. durchgeführt. Anhand weiterführender Analysen, an vorab definierten thorakalen Aortenabschnitten cholesterinreich ernährter NZW-Kaninchen, wird angestrebt, die qualitative Auswertung zu verbessern und erste quantitative Analysen durchzuführen. Mithilfe von Mikroskop-gekoppelten IR- und Raman-Spektrometern sollen die hiermit erhaltenen Daten bildlich, in Form von Falschfarbenbildern dargestellt werden.

4 METHODIK

4.1 VERSUCHSTIERE UND TIERHALTUNG

Für die Untersuchungen wurden Aorten von fünf männlichen *New Zealand White* Kaninchen (Harlan, Borcheln, Deutschland) eingesetzt. Das Alter der Tiere lag zu Versuchsbeginn bei ca. 13 Wochen, das durchschnittliche Körpergewicht bei 3039 ± 169 g. Die Tierhaltung erfolgte in Einzelkäfigen bei einem durch künstliche Beleuchtung hergestellten Tag-Nacht-Rhythmus von 12 Stunden, einer Raumtemperatur von 18 - 20 °C und 60%iger Luftfeuchtigkeit. In einer 14tägigen Eingewöhnungsphase erhielten die Tiere Standardfutter (ssniff® K-H, Soest, Deutschland). Während einer dreitägigen Übergangsphase wurde das Standardfutter im Verhältnis 1 zu 1 mit einem 0,5 % cholesterinreichem Experimentalfutter (ssniff® EF K Fett- und Cholesterin-reich, Soest, Deutschland) kombiniert, wobei im weiteren Verlauf für neun Wochen ausschließlich die cholesterinreiche Diät verabreicht wurde. Futter und Wasser stand den Tieren während der kompletten Studiendauer ad libitum zur Verfügung. Labor- und Gewichtskontrollen fanden jeweils zu Beginn der Studie und am Tag der Gefäßentnahme statt. Ebenfalls wurde die tägliche Nahrungsaufnahme dokumentiert. Die Haltung, operative Versorgung und Euthanasie der Tiere fand am Institut für Versuchstierkunde der Friedrich-Schiller-Universität Jena statt.

Eine entsprechende Genehmigung für das Tierversuchsvorhaben, welchem die Aorten entstammen, liegt vor (TLLV 02-021-10).

4.2. INTERVENTIONSABLÄUFE

4.2.1 GEFÄßENTNAHME / PROBENGEWINNUNG

Nach Ablauf der neunwöchigen cholesterinreichen Diät wurde jedem der Tiere die später zu untersuchende Aorta komplett entnommen. Ebenfalls fand zu diesem Zeitpunkt eine weitere Gewichtskontrolle und Blutentnahme statt.

4.2.2 NARKOSE

Über einen in die marginale Ohrvene gelegten venösen Zugang wurden die Kaninchen mit einem Gemisch aus Ketamin 2 - 8 mg/kg KG (Ketamin "Gräub" 10 %, Albrecht, Aulendorf; Deutschland) und Xylazin 0,5-1 mg/kg KG (Rompun Trockensubstanz, Bayer, Leverkusen, Deutschland) intravenös anästhetisiert. Die Tötung der Kaninchen erfolgte im narkotisierten Zustand durch eine letale Dosis des Mischanästhetikums.

4.2.3 PERFUSIONSFIXIERUNG DER GEFÄßE

Die Kaninchen wurden in Rückenlage auf dem Untersuchungstisch fixiert und an Thorax und Abdomen rasiert. Nach stattgefundener Laparotomie und dem Verlagern des Darmpaketes nach außen, konnte der Verlauf der Aorta abdominalis vollständig dargestellt werden. Vor dem Einführen der Perfusionskanüle in den distalen Abschnitt der Bauchaorta wurden zwei Gefäßklemmchen nahe der Aortenbifurkation im Abstand von 2 cm zueinander angebracht. Über eine Inzision im abgeklemmten Bereich konnte die Kanüle eingeführt und durch Lagekorrektur der proximalen Gefäßklemme fixiert werden. Die retrograde Perfusion der Aorten erfolgte mit 150 ml eines Gemisches, bestehend aus 10%igem HES (Fresenius Kabi Deutschland GmbH, Bad Homburg, Deutschland) und 1%igem Procain (JENAPHARM®, mibe GmbH, Brehna, Deutschland) im Verhältnis 10:1. Anschließend folgte eine 15-minütige Druckperfusion mit 0,9%iger NaCl-Lösung (Fresenius Kabi Deutschland GmbH, Bad Homburg, Deutschland) bei 100 mmHg. Die Perfusionsfixierung erfolgte zum Erhalt der ursprünglich vorhandenen Gefäßstruktur.

4.2.4 PRÄPARATION UND ENTNAHME DER GEFÄßE

Im Anschluss an die Perfusionsfixierung folgte die vollständige Präparation und Entnahme der Kaninchenaorten vom Herzansatz bis hin zur Aortenbifurkation. Zusätzlich zur Laparotomie wurden hierfür eine Thorakotomie und die Durchtrennung des Diaphragmas notwendig. Bis zur weiteren Bearbeitung erfolgte eine Aufbewahrung der Präparate in vorbereiteten, luftdichten Gefäßen mit 5%iger PBS-gepufferter Formaldehydlösung (Oscar Fischer GmbH, Saarbrücken, Deutschland) im Kühlschrank bei 6 °C. Die Fixierung diente dem Erhalt der ursprünglichen Gewebemorphologie.

4.2.5 DETEKTION LIPIDHALTIGER AORTENABSCHNITTE

Zur Detektion lipidhaltiger Stellen in den Aorten wurde eine Raman-Sonde genutzt, deren Aufbau im Einzelnen unter Matthäus et al. 2012 beschrieben wird. Die Einführung derselben in das Gefäß erfolgte behutsam von proximal nach distal, wobei der abdominelle Abschnitt der Aorten aufgrund des Sondendurchmessers von 1,5 mm nicht spektroskopisch beurteilt werden konnte. Beim Zurückziehen der Sonde wurden spektroskopische Messungen durchgeführt und lipidhaltige Gefäßabschnitte konnten aufgrund typischer Spektralinformation von wenig lipidhaltigen Bereichen abgegrenzt werden. Markierungen für die spätere Identifikation der interessierenden Gefäßsegmente erfolgten mit Tinte. Pro Aorta wurden vier Abschnitte im Bereich des thorakalen Aortensegments entnommen und im weiteren Verlauf histologisch aufgearbeitet und untersucht.

4.3 HISTOLOGISCHE GEFÄßPRÄPARATE

Die als lipidhaltig detektierten 1 cm langen Gefäßabschnitte der entnommenen Aorten wurden anhand histologischer Färbungen und schwingungsspektroskopischer Mikroskopie-Verfahren auf ihre Zusammensetzung hin untersucht. Um eine größtmögliche morphologische Ähnlichkeit der hergestellten Kryostat- und Paraffinpräparate zu erreichen, wurden die 1 cm langen aortalen Segmente mittig erneut geteilt und die der Schnittstelle zugewandte Seite für die Generierung der Gefäßschnitte genutzt.

4.3.1 HERSTELLUNG VON KRYOSTATPRÄPARATEN

Für die Erstellung der Kryostatpräparate wurden die ca. 5 mm langen Gefäßsegmente an der distalen Schnittstelle mithilfe von Tissue-Tek® O.C.T.TM Compound Einbettmedium (Sakura, Niederlande) auf einer Korkplatte angebracht und in stickstoffgeköhltem flüssigem Propan schockgefroren. Die anschließend mittels Mikrotom-Kryostat (Cryo-Star HM 560, Microm, Walldorf, Deutschland) hergestellten 10 µm dicken Schnitte wurden für die Sudanschwarz-Färbung auf Glas-Objektträger (OT Menzel-Gläser, SuperFrost®plus, Wiesbaden, Deutschland) aufgebracht. Die auf CaF₂-Objektträger (Crystal GmbH, Berlin, Deutschland) überführten Kryostatpräparate blieben ungefärbt, um für die Infrarot- und Raman-mikroskopischen Untersuchungen verwendet werden zu können.

4.3.2 HERSTELLUNG VON PARAFFINPRÄPARATEN

Die in 5%iger PBS-gepufferter Formaldehydlösung fixierten, ca. 5 mm langen Gefäßsegmente wurden mithilfe eines Gewebeeinfiltrationsautomaten (Hypercentre, Shandon, Deutschland) in einer aufsteigenden Alkoholreihe dehydriert und in Paraffin (Histosec-Pastillen 56-58C, Merck, Deutschland) überführt. Eine Paraffinüberschichtung der entsprechend ausgerichteten Gefäßsegmente erfolgte in speziellen Förmchen. Der Aushärtungsprozess des Paraffins fand bei Raumtemperatur statt. Die so entstandenen Paraffinblöcke wurden im Anschluss mithilfe eines Rotationsmikrotoms (RM2045, Leica, Bensheim, Deutschland) zu 4 µm dicken Schnitten verarbeitet, auf Objektträger (OT Menzel-Gläser, SuperFrost®plus,

Braunschweig, Deutschland) aufgezogen und anschließend für 6 Stunden bei 60 °C im Trockenschrank (Medax, Kiel, Deutschland) aufbewahrt. Das Entparaffinieren der Präparate fand wie folgt statt: Spülen in Xylol für 3 mal 15 min, in Aceton für 4 mal 2 min, in Aceton/Aqua dest. (2:1) für 2 min, in Aqua dest./Aceton (2:1) für 2 min und mehrmals in Aqua dest..

4.3.3 HÄMATOXYLIN-EOSIN-FÄRBUNG

Mit Hämalun nach Mayer (MERCK, Darmstadt, Deutschland) wurden die Zellkerne für 1 min gefärbt und kurz unter warmem Leitungswasser gebläut. Anschließend fand die Färbung in alkoholischer Eosin-Y-Lösung (Sigma-Aldrich, Hamburg, Deutschland) für 90 s statt. Im Folgenden wurden die Präparate mit 70%igen Ethanol, 2 x 96%igen Ethanol, 2 x 100%igen Ethanol für jeweils 90 s gespült. Hieran schloss sich die Überführung in Xylol mit einer abschließenden Eindeckung in Entellan (MERCK, Darmstadt, Deutschland) an.

4.3.4 ELASTICA VAN GIESON-FÄRBUNG

Die entparaffinierten, rehydrierten Gefäßschnitte wurden für ca. 30 min mit Resorcin-Fuchsin-Lösung (ROTH, Karlsruhe, Deutschland) gefärbt. Anschließend erfolgte die Differenzierung in 96%igem Ethanol, welche durch kurzes Spülen mit Aqua dest. unterbrochen wurde. Im Weiteren erfolgte eine 10-minütige Behandlung der Schnitte mit Eisenhämatoxylin nach Weigert (ROTH, Karlsruhe, Deutschland). Danach wurden diese mit Aqua dest. gespült, für weitere 10 min in warmen Leitungswasser gebläut und nachfolgend für ebenfalls 10 min in einer van Gieson-Farbstofflösung (Dr. K. Hollborn & Söhne, Leipzig, Deutschland) belassen. Eine zügige Entwässerung der Präparate erfolgte daraufhin mithilfe einer aufsteigenden Alkoholreihe, woran sich die Überführung in Xylol und eine abschließende Eindeckung in Entellan (MERCK, Darmstadt, Deutschland) anschloss.

4.3.5 SUDANSCHWARZ-FÄRBUNG

Mittels Sudanschwarz-Lösung (ROTH, Karlsruhe, Deutschland), bestehend aus 0,1 g Sudanschwarz in 100 ml 70%igem Ethanol, wurden die Präparate für ca. 5 min gefärbt. Eine Spülung derer mit Aqua dest. folgte, bevor sie für weitere 7 min mit einer Kernechtrot-Aluminiumsulfat-Lösung (ROTH, Karlsruhe, Deutschland) gegengefärbt wurden. Nach erneutem Spülen der Schnitte mit Aqua dest. erfolgte die Eindeckung dieser mit Glycerol-Gelatine (SERVA, Heidelberg, Deutschland).

4.4 MORPHOMETRIE

Die morphometrische Auswertung der Präparate erfolgte an den EvG-Färbungen.

4.4.1 GERÄTE UND SOFTWARE

Für die morphometrische Auswertung der EvG-gefärbten Gefäßschnitte wurden folgende Geräte benutzt:

Mikroskop:	Keyence digital Mikroskop- Durchlicht-Modus; VHX-700s (Keyence, Neu-Isenburg, Deutschland)
Objektiv:	20x – 200x Zoom-Objektiv, gerätintegriert
Digitalkamera:	2,11 Mio Pixel CCD-Bildsensor
Software:	gerätspezifische Software zum Vermessen und Markieren

4.4.2 PLAQUEFLÄCHE

Die Beurteilung der Plaquefläche (mm^2) erfolgte an den EvG-gefärbten Gefäßpräparaten mittels mikroskopspezifischer Vermessungssoftware. Hierfür wurde die Fläche des Lumens von dem zwischen Lumen und Lamina elastica interna liegenden Areal subtrahiert.

4.4.3 INTIMA-MEDIA-VERHÄLTNIS

Zur Generierung des Intima-Media-Verhältnisses wurden ebenfalls die EvG-gefärbten Gefäßanschnitte vermessen. Die Fläche der Intima ist identisch mit der Plaquefläche und entspricht somit dem Areal zwischen der Lamina elastica interna und dem Lumen. Als Media ist die Fläche zwischen der Lamina elastica interna und der Lamina elastica externa definiert. Die morphometrisch ermittelten Werte der Intima und Media wurden anschließend ins Verhältnis gesetzt.

Nach zweimaligem Vermessen jedes Gefäßanschnittes konnte somit aus den erhaltenen Größen das arithmetische Mittel gebildet werden.

4.5 FTIR-MIKROSKOPIE

4.5.1 GERÄTE UND SOFTWARE

Die FTIR-Transmissions-Bilder wurden mithilfe eines FTIR-Spektrometers (Model 670, Agilent, Santa Clara, USA) und eines daran gekoppelten FTIR-Mikroskops mit 64 x 64 FPA-(Focal Plane Array) Detektor (Model 620, Agilent, Santa Clara, USA) generiert. Das Mikroskop war mit einem Cassegrain-Spiegelobjektiv (15x, NA 0.4) ausgestattet. Um eine Beeinträchtigung der Spektren mit atmosphärischem Wasser zu minimieren, wurde das Mikroskop durch eine eigens angefertigte Box umschlossen und mit trockener Luft gespült. Mittels mikroskopinterner Digitalkamera wurde der zu untersuchende Gefäßabschnitt festgehalten. Als Datenaufnahme-Software kam hier die Version 5.2.0 von Resolutions Pro zum Einsatz.

Jedes generierte Bild umfasst, bei einer Pixelfläche von $5,5 \times 5,5 \mu\text{m}^2$, einen Probenbereich von $352 \times 352 \mu\text{m}^2$. Mithilfe eines Mosaik-Datenerfassungs-Modus konnten größere Probenbereiche aufgenommen werden. Hierfür wurden FTIR-Bildserien generiert und zu einem Übersichtsbild zusammengestellt. Die entstandenen Mosaike bestehen aus 12×12 Einzelaufnahmen. Ebenfalls wurde zur Addition benachbarter Pixelsignale ein 4×4 Binning-Modus eingesetzt. Neben den Übersichtsbildern wurden pro Präparat drei Einzelbilder generiert, welche eben jenem Probenbereich von $352 \times 352 \mu\text{m}^2$ umfassen und sowohl Intima als auch Media des jeweiligen Gefäßes anteilig abzeichnen. Jedes IR-Spektrum ist im Spektralbereich zwischen 900 und 3600 cm^{-1} mit einer spektralen Auflösung von 8 cm^{-1} zweimalig generiert worden. Bei diesen Untersuchungen wurde kein Binning-Modus eingesetzt.

4.5.2 DATENBEARBEITUNG / BILDANALYSE DER IR-DATEN

Zum Beseitigen von IR-Spektren, welche nur eine geringe Absorbanz aufweisen, ist die Software CytoSpec eingesetzt worden. Weiterhin wurden mit diesem Programm irrelevante Freiräume neben den Proben entfernt, welche sich aus unterschiedlichen Gefäßdurchmessern und dem einheitlich verwendeten 12×12 Mosaik-Modus ergaben. Für die graphischen Auswertungen wurden die FTIR-Daten in MatLab (Mathworks, Naticks, USA) importiert. Für die Durchführung der Vertex-

Komponenten-Analysen (VCA) wurden pro aufgenommenes Bild vier bis sechs Endmember zur Substanzklassifizierung festgelegt. Diese Endmember repräsentieren die entsprechenden Spektren des Datensets einer Probe, welche die größtmöglichen Unterschiede besitzen und somit eine Differenzierung zwischen Lipid- und Proteinkomponenten ermöglichen sollen. Im Anschluss an die Substanzdiskriminierung fand die komponentenspezifische Transformation in ein entsprechendes Falschfarbenbild statt. Lipide wurden hierbei in gelb, die Proteine in türkis markiert. Die separate Darstellung der einzelnen Komponenten erfolgt weiterhin zur besseren Beurteilung derer. Neben der VCA wurde zusätzlich eine Hierarchische Cluster-Analyse (HCA) durchgeführt. Mithilfe derer Spektren der größtmöglichen Ähnlichkeit gruppiert und farblich differenziert dargestellt werden konnten.

4.6 RAMAN- MIKROSKOPIE

4.6.1 GERÄTE UND SOFTWARE

WITec-Mikroskop: Die Raman-Bilder mit einer Fläche von $100 \times 100 \mu\text{m}^2$ wurden mithilfe eines konfokalen Raman-Mikroskops (Model CRM Alpha 300 Rplus, WITec, Ulm, Deutschland) generiert. Zur Anregung, bei einer Wellenlänge von 785 nm, wurde ein Singlemode-Diodenlaser genutzt (WITec, Ulm, Deutschland). Die Messungen wurden mit einer Laserleistung von ca. 20 mW an der Probe durchgeführt. Der einfallende Laserstrahl wurde mittels 50er Objektiv (Zeiss EC Epiplan Apochromat 50x /0.95 NA) auf der Probe fokussiert. Das Scannen dieser erfolgte in einem Rastermuster in der xy-Ebene mit konstanter Tischgeschwindigkeit von einem Bruchteil von 2 $\mu\text{m/s}$, welche die Probe vor Degradation im Bereich des Laserfokus schützt. Die Spektren wurden mit einer Auflösung von 1 μm und einer Integrationszeit von 0,5 s aufgenommen. Die spektrale Auflösung, unter Verwendung eines 300 mm^{-1} Gitters, betrug ca. 6 cm^{-1} , in einem Bereich von 500 bis 3100 cm^{-1} . Bei den hier vorliegenden Messungen betrug der Durchmesser des Laser-Spots ca. 0,5 μm .

Kaiser-Mikroskop: Raman-Übersichts-Bilder wurden im Rückstreuungsmodus mithilfe eines Raman-Systems (Holoprobe, Kaiser Optical Systems, Ann Arbor, USA) aufgenommen. Dieses System enthält einen Multimode-Diodenlaser mit Emission bei 785 nm (Invictus, Kaiser, Ann Arbor, USA), einen f/1.8-Spektrographen mit einem holographischen Transmissionsgitter (Kaiser, Ann Arbor, USA) und einer CCD-Kamera (Andor, Belfast, Vereinigtes Königreich) mit Peltier-Kühlung. Das Mikroskop ist über optische Fasern sowohl mit dem Laser als auch mit dem Raman-Spektrometer verbunden. Raman Spektren wurden mit einer Aufnahmezeit von zweimal 7 s generiert, wobei der Faktor zwei für die automatisch durchgeführte kosmische Spike-Korrektur notwendig war. Bei einer Laserleistung von 400 mW wurde ein 60x /1.0 NA Wasser-Immersionsobjektiv (Nikon, Tokio, Japan) für die Datengenerierung genutzt. Während der Raman-Aufnahmen befanden sich die zu untersuchenden Proben in einer mit PBS-Puffer gefüllten Glasschale. Jedes Raman-Spektrum wurde im Intervall von -35 - 3455 cm^{-1} und einer spektralen Auflösung von 4 cm^{-1} generiert. Die Belichtungszeit betrug hierbei 14 s. Dunkelstrom- und

Intensitäts-Kalibrierungen wurden mithilfe der Spektrometer-Software Holograms durchgeführt. Eine MatLab-Grafik-Nutzer-Interface (Mathworks, Natick, USA) zum automatischen Messen der interessierenden Region wurde hierbei verwendet (Beleites et al. 2011). Die ringförmige Kontur der zu untersuchenden Gefäßanschnitte wurde mithilfe einer motorisierten Bühne (Proscan II, Prior, Rockland, USA) unter dem Spektrometer-Mikroskop (Leica, Wetzlar, Deutschland) aufgenommen. Für die Messungen wurde ein quadratisches Rastermuster mit einer Schrittweite von 20 μm kalkuliert. Das somit gemessene Areal wurde durch eine Sicherheitslinie von 2 Spektren ergänzt. Bei den hier vorliegenden Messungen betrug der Durchmesser des Laser-Spots ca. 5 μm bei einer Leistungsdichte von 40 mW auf der Probe. Das erwähnte MatLab-Interface wurde durch ein Modul erweitert, welches den Fokus Z als Funktion der X- und Y-Position modellierte. Diese Software bewegt den Mikroskoptisch in allen 3 Ebenen und triggert die spektrale Erfassung über das Hologram's DDE-Interface.

4.6.2 DATENBEARBEITUNG /BILDANALYSE DER RAMAN-DATEN

Im Vorfeld der Datenbearbeitung wurden die flächenmäßig kleineren Raman-Bilder, welche ein Areal von 100 x 100 μm^2 umfassen, mithilfe der Software Project, Version 2.08 (WITec, Ulm, Deutschland) von, durch kosmische Strahlung verursachten, Artefakten bereinigt. Die graphische Auswertung der generierten Bilder erfolgte ebenfalls in der Matlab-Software. Für die Durchführung der VCA wurden, ähnlich der FTIR-Bild-Analyse, je abgescanntem Probenbereich zwischen vier und sechs Endmember zur Substanzklassifizierung bestimmt. Neben einer Differenzierung zwischen Lipid- und Proteinkomponenten, wurde bei den Raman-Bildern eine Subklassifizierung der vorhandenen Lipidkomponenten in Cholesterinester, Cholesterin, Phospholipide und Triglyzeride angestrebt. Im Anschluss an die Substanzdiskriminierung fand auch hier eine komponentenspezifische Transformation in ein entsprechendes Falschfarbenbild statt. Die Kennzeichnung der Proteine erfolgte hierbei wieder in türkis, Cholesterinester wurden gelb, Cholesterol grün und Phospholipide/ Triglyzeride rot markiert. Neben einer gleichzeitigen Darstellung der einzelnen Komponenten wurden diese auch hier farblich in separaten Bildern dargestellt.

Die Raman-Übersichtsbilder wurden in das R-Programm (R. CoreTeam 2012) importiert und mithilfe von hyperSpec (C. Beleites and V. Sergo 2012) und R.matlab (H. Bengtsson and J. Riedy 2012) bearbeitet. Die Wellenlängenkalibrierung wurde von der Instrumenten-Software auf die Roh-CCD-Spektralkanäle transferiert. Spektren mit einer zu hohen bzw. zu niedrigen Intensität wurden herausgefiltert und so geschnitten, dass Regionen mit niedrigen ($375\text{-}1800\text{ cm}^{-1}$) bzw. hohen Wellenzahlen ($2340\text{-}3150\text{ cm}^{-1}$) entstanden. Diese erfuhren separat eine Basislinien-Korrektur und Normalisierung. Anschließend wurden diese zusammengefügt. Im Folgenden konnten die Daten mithilfe des reshape2-Programms (H. Wickham 2007) in eine 3D-Anordnung überführt werden, welche für die Durchführung der Vertex-Komponenten-Analyse geeignet ist. Anschließend erfolgte ein Datenexport in die Matlab-Software. Das folgende Procedere entspricht dem bereits Beschriebenen der flächenmäßig kleineren Raman-Bilder.

4.7 STATISTISCHE AUSWERTUNG

Die erhaltenen Spektralinformationen wurden nicht direkt interpretiert, sondern mithilfe von statistischen Verfahren ausgewertet und entsprechend beurteilt.

Im Rahmen der durchgeführten Untersuchungen kamen hierbei die Hierarchische Cluster-Analyse (HCA) und die Vertex-Komponenten-Analyse (VCA) zum Einsatz.

Die HCA entspricht hier einer Art Datenanalyse, bei der die generierten hyperspektralen Daten der Ähnlichkeit nach geordnet und in Cluster sortiert werden. Die in einem einzelnen Cluster enthaltenen Datensätze besitzen dabei zueinander eine größtmögliche Ähnlichkeit und weisen zu den weiteren Clustern eine größtmögliche Distanz auf ((Miljković et al. 2010); Heedegard et al. 2011). Darauf aufbauend ist eine Darstellung der einzelnen Cluster als Falschfarbenbilder möglich.

Eine weitere Methode zum schnellen Ordnen von hyperspektralen Datensätzen stellt die VCA dar. Diese basiert auf der Annahme, dass jedes generierte Spektrum als n-dimensionaler Vektor in einem n-dimensionalen Raum gesehen werden kann und jeder Wellenzahl eine bestimmte Koordinate in diesem System zugeordnet ist. Durch die VCA wird jedes Spektrum der hierbei erhaltenen Datenmatrix in eine lineare Kombination von Endmember-Spektren aufgeschlüsselt. Jedem dieser Endmember-Spektren wird anhand der spektralen Ähnlichkeit eine gewisse Menge Spektren zugeordnet ((Miljković et al. 2010); Heedegard et al. 2011). Auch hier können auf Grundlage der vorliegenden Endmember Falschfarbenbilder generiert werden.

5 ERGEBNISSE

5.1 REFERENZSPEKTREN

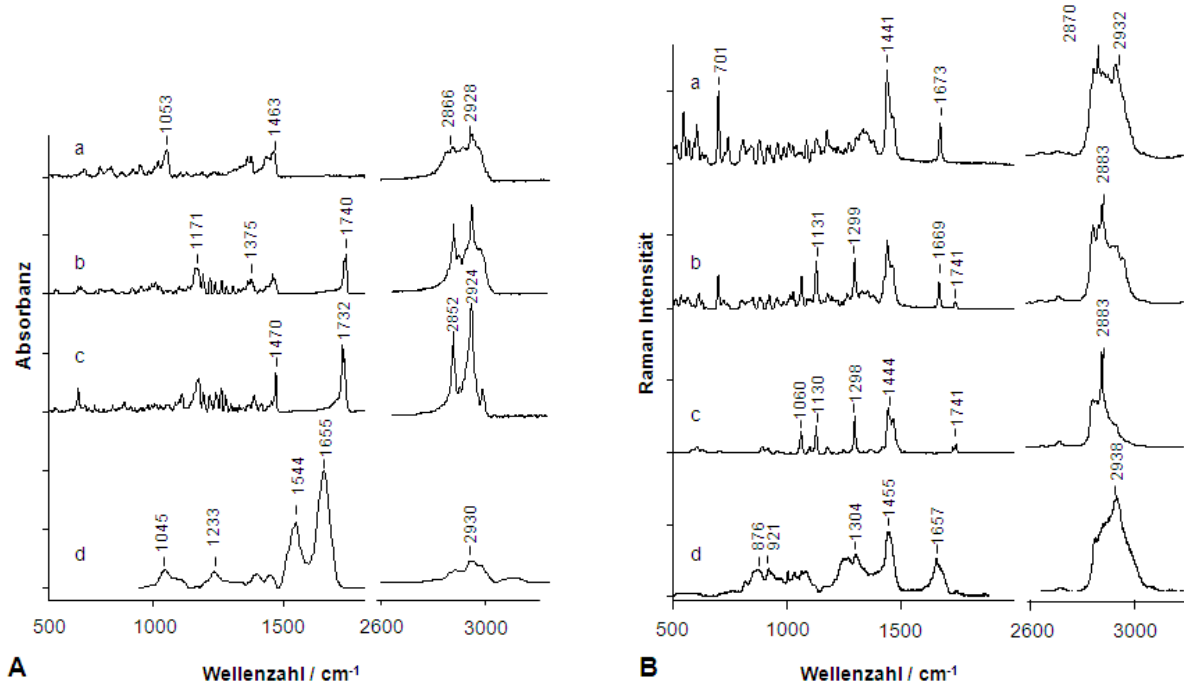


Abb. 3 IR- und Raman-Referenzspektren.

Repräsentative Referenzspektren typischer atherosklerotischer Plaquekomponenten, IR-(A) und Raman-(B)Referenzspektren typischer Bestandteile atherosklerotischer Ablagerungen; Cholesterin (a), Cholesterinester (b), Triglyzerid (c), Kollagen (d). Adaptiert von Abb. 1 in Lattermann et al. 2013.

Die IR-Spektren von Cholesterin (Abb. 3A(a)), Cholesterin-Palmitat (Abb. 3A(b)) und Tripalmitin (Abb. 3A(c)) zeigen sehr ausgeprägte CH-Streckschwingungen zwischen 2800 und 3100 cm^{-1} , welche für Kollagen weniger ausgeprägt vorzufinden sind. Streckschwingungen der Carbonyl-Gruppe des Cholesterinesters liegen bei 1740 cm^{-1} . Sowohl Cholesterin als auch Cholesterinester weisen zahlreiche weitere spektrale Merkmale geringerer Intensität zwischen 1000 und 1500 cm^{-1} auf. Die hier vorliegenden Banden sind neben verschiedenartigsten -C-H- und -C-C-Deformationsschwingungen des Steran-Rings auch durch eben solche Schwingungen der aliphatischen Seitenkette an der Esterposition bedingt. Die C=O- Carbonylester-Streckschwingung des Tripalmitin findet sich in dem IR-

Spektrum bei 1732 cm^{-1} . Ebenfalls treten die bei 1470 cm^{-1} existenten CH_2 -Deformationsschwingungen deutlich hervor. Die wesentlichen Unterschiede, bezogen auf die Spektren von Cholesterinestern und Triglyzeriden, zeigen sich in der Bandenform der CH-Streckschwingungen, der Position der C=O-Streckschwingungen und weiteren spektralen Merkmalen, welche bei 1375 und 1171 cm^{-1} des Cholesterinesters deutlich hervortreten. Beim IR-Spektrum des Kollagens (Abb.3A(d)) sind die Banden in der Region unterhalb von 1800 cm^{-1} am stärksten ausgeprägt. Die C=O-Streckschwingung, auch als Amid-I-Bande bezeichnet, liegt bei 1655 cm^{-1} , die Amid-II-Bande tritt bei 1544 cm^{-1} am deutlichsten hervor und die Amid-III-Bande ist bei 1233 cm^{-1} am ausgeprägtesten.

Das Raman-Spektrum des Cholesterins (Abb. 3B(a)) wird von den CH-Streckschwingungen zwischen 2800 und 3100 cm^{-1} dominiert. Die aus der Doppelbindung, zwischen Position 5 und 6 des B-Rings, resultierende Schwingung konnte bei 1673 cm^{-1} detektiert werden, die CH_2 -Scherschwingungen bei 1441 cm^{-1} . Auch hier finden sich weitere Banden geringerer Intensität, welche auf komplexe Deformationsschwingungen des konjugierten Ringsystems zurückzuführen sind. Neben den typischen Cholesterinbanden zeigt das Cholesterin-Palmitat (Abb. 3B(b)) eine Streckschwingung der C=O-Bindung bei 1741 cm^{-1} und CH-Deformationsschwingungen des Fettsäurerestes bei 1131 und 1299 cm^{-1} . Die C=C-Streckschwingung ist hier auf 1669 cm^{-1} verlagert. Das Tripalmitin-Spektrum (Abb. 3B(c)) zeigt ebenfalls hohe Intensitäten in der CH-Bandenregion, mit einem Maximum bei 2883 cm^{-1} und CH_2 -Deformationsschwingungen bei 1441 cm^{-1} . Die Carbonyl-Schwingung der Ester-Bande ist bei 1741 cm^{-1} lokalisiert. Das Kollagen-Spektrum (Abb.3B(d)) weist typische Merkmale von Proteinen auf. Die C=O-Schwingung hat ein Maximum bei 1675 cm^{-1} . Den CH_2 -Scherschwingungen bei 1455 cm^{-1} folgen weitere C-H- und N-C-Schwingungen zwischen 1140 und 1380 cm^{-1} , welche oft als Amid-III-Bande bezeichnet wird. Charakteristische Kollagenbanden sind bei 876 und 921 cm^{-1} zu finden. Hierbei handelt es sich um Schwingungen der linksgängigen Tripelhelix, welche durch die unterschiedlichen Aminosäuresequenzen Gly-Pro-X und Gly-X-Hyp charakterisiert sind. Das Maximum der CH-Streckschwingungen befindet sich bei 2938 cm^{-1} .

5.2 MIKROSPEKTROSKOPIEN

5.2.1 FTIR-MIKROSKOPIE

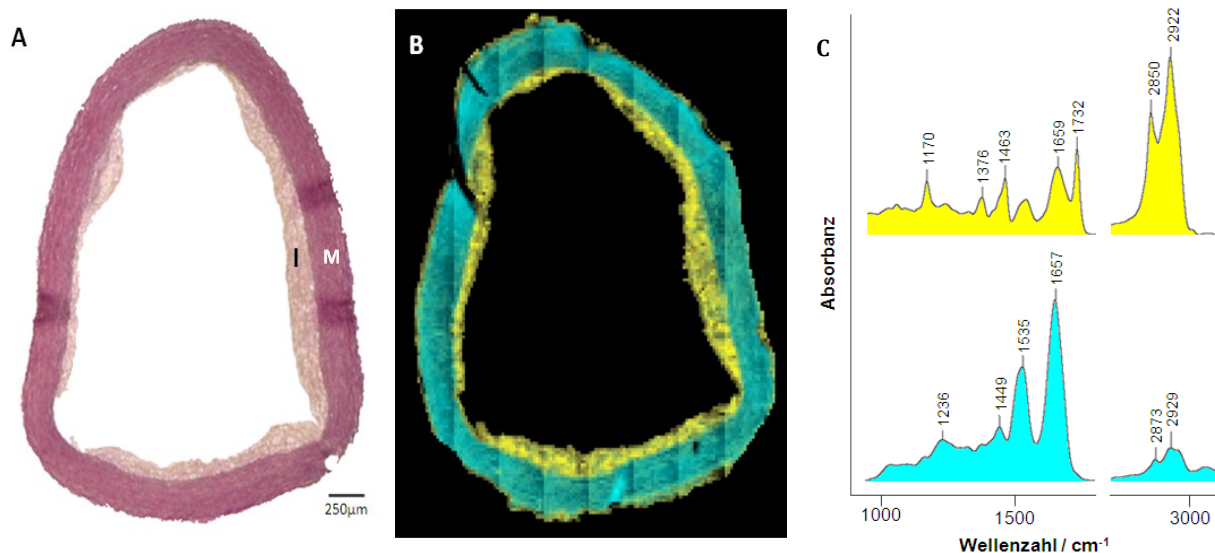


Abb. 4 Vergleich eines histomorphologisch und IR-mikrospektroskopisch bearbeiteten Gefäßquerschnittes.

EvG-behandelter Querschnitt einer thorakalen Aorta (A), IR-mikroskopisches Falschfarbenbild eines ungefärbten Parallelschnittes (B) mit klar abgrenzbarer Intima (I) und Media (M); farblich korrespondierende IR-Spektren (C), welche zwischen protein- (türkis) und fettreichen (gelb) Membranbestandteilen unterscheiden. Adaptiert von Abb. 2 in Lattermann et al. 2013.

Der in Abb. 4A gezeigte Querschnitt eines EvG-gefärbten thorakalen Aortensegmentes lässt eine Differenzierung zwischen Intima (I) und Media (M) zweifelsfrei zu. Hierbei sind elastische Fasern vor allem im Bereich der Intima und kollagene Fasern vorwiegend in der Media zu finden. Das an das Gefäßlumen grenzende intimale Areal erscheint pathologisch verändert. Der via FTIR-Mikroskopie abgescannte und mittels VCA bearbeitete ungefärbte Parallelschnitt (Abb. 4B) lässt ebenfalls eine Unterscheidung zwischen Gefäßintima und -media zu, und korrespondiert so mit dem Resultat der EvG-Färbung. Mithilfe der IR-Mikroskopie konnten zwei Hauptkomponenten voneinander getrennt differenziert werden: ein lipidreicher, gelb dargestellter Bereich, welcher sich mit dem der Intima deckt und ein vorwiegend aus Proteinen bestehendes, türkis markiertes Areal, welches in der

histologischen Färbung der Fläche der Media entspricht. In den mittels VCA bearbeiteten Querschnitten zeigen Helligkeitsunterschiede einer Farbe unterschiedliche Konzentrationen der vorliegenden Komponenten an. Hellere Areale entsprechen hierbei stärker konzentrierten Bereichen des jeweiligen Bestandteils. Dies zeigt sich im Beispiel besonders an der inhomogen gelben Fläche der Intima. Im Übergangsbereich zwischen Intima und Media erscheint hier ein eher dunklerer, grünlicher Farbton, welcher somit auf das Vorliegen zweier, hierbei berücksichtigter, Komponenten hinweist. Die farblich korrespondierenden Spektren sind in Abb. 4C dargestellt, wobei die gelbe Komponente eindeutig durch spektrale Merkmale von Cholesterinestern dominiert wird. Charakteristische Banden mit ihren Maxima bei 1170, 1376, 1463, 1732, 2850 und 2922 cm^{-1} zeigen die Vergleichbarkeit des Bandenmusters zu den in Abb. 3A(a-c) vorhandenen Referenzspektren. Ein für Proteine typisches Muster mit Bandenmaxima bei 1226, 1449, 1535 und 1657 cm^{-1} korrespondiert ebenfalls mit den Referenzen in Abb. 3A (d).

Neben den Vertex-Komponenten-Analysen, wie sie in Abb. 4B und Abb. 5A zu sehen sind, wurden zusätzlich Hierarchische Cluster-Analysen (Abb. 5B und 6A) an den zu untersuchenden Gefäßquerschnitten durchgeführt. Ähnlich der VCA (Abb. 5A) lassen sich in Abb. 5B bei den ausgewählten Clustern unterschiedliche Intensitäten der detektierten Lipid- und Proteinkomponente aufzeigen. Die hier olivgrün und grau markierten Lipidanteile besitzen ein deutliches Verteilungsmuster, wobei die lipidreicheren grünen Areale großflächig an das Lumen grenzen, die eher lipidarmen grauen Bereiche im unteren, der Gefäßmedia zugewandten Abschnitt zu finden sind. Die proteinreichen Anteile, in blau, türkis und rosa dargestellt, weisen auf entsprechend unterschiedliche Protein-Konzentrationen hin. Das türkisfarbene Areal füllt hierbei die Media flächig aus. Im Übergangsbereich zwischen Intima und Media, direkt im Verlauf der LEI, sticht der blaue Proteinanteil abgrenzend hervor. Eine Umschlagfalte der Media, im oberen rechten Anteil des Gefäßquerschnittes grenzt sich hingegen rosa ab. Diese Ergebnisse zeichnen sich ebenfalls im mittels VCA bearbeiteten Bild (Abb. 5A) ab, welches hier anhand der Helligkeits- und Farbunterschiede vergleichend interpretiert werden kann. Die farblich den einzelnen Clustern entsprechenden Spektren sind in Abb. 5C aufgezeigt. Ähnlich denen mittels VCA und HCA bearbeiteten Querschnitten zeigte sich die Verteilung der Lipide in

Abb. 5D. Bei der hier durchgeführten Färbung eines entsprechenden Parallelschnittes mit Sudanschwarz stellen sich Lipidansammlungen schwarz dar und sind in diesem exemplarischen Beispiel besonders lumennah sehr konzentriert aufzufinden. Die zum Teil auch konfluierenden Lipidansammlungen rarefizieren sich in Richtung Media zunehmend.

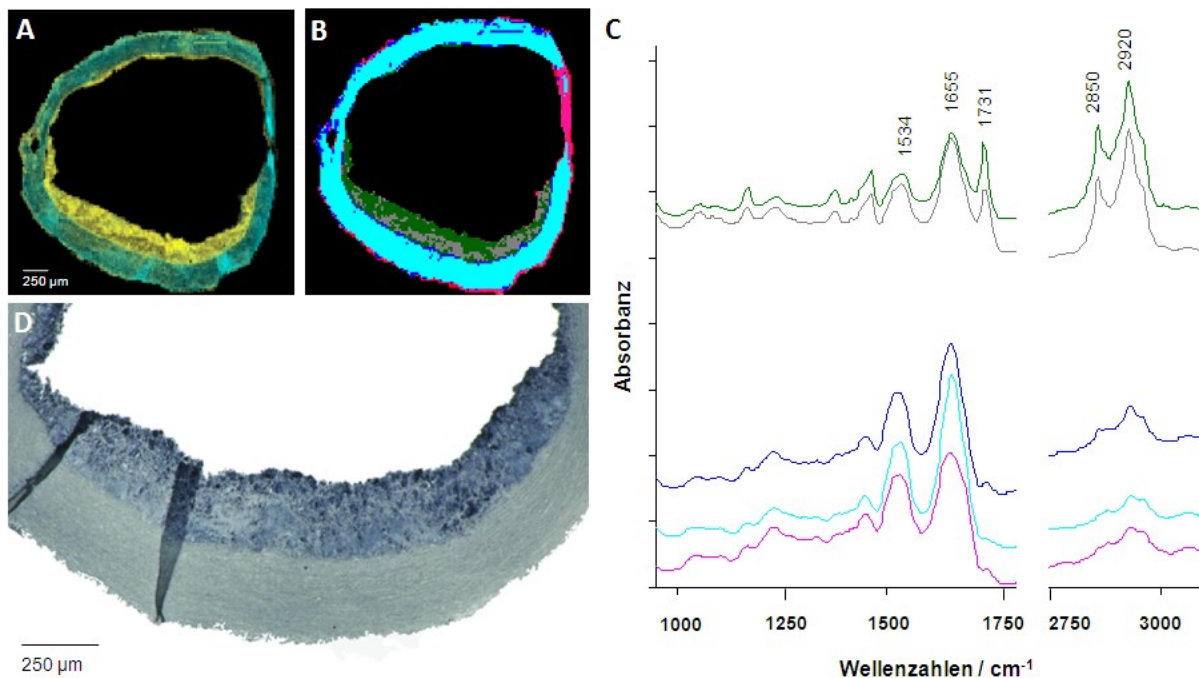


Abb. 5 Protein-Lipid-Verteilungsmuster nach IR-Mikrospektroskopie und Lipidfärbung eines Gefäßquerschnittes.

IR-spektroskopische Darstellung des Protein-Lipid-Verteilungsmusters eines thorakalen Aortenquerschnittes nach Bearbeitung mittels VCA (A) und HCA (B). In A stellen sich Lipide gelb, Proteine türkis dar und zeigen eine deutliche Korrespondenz mit der Sudanschwarz-Färbung in D. Die Clusteranalyse in B zeigt mit türkis, blau, rosa die Protein- und mit grün, grau die Lipidkomponenten an. Entsprechend farbkodiert finden sich die korrespondierenden Spektren in C.

Neben den großen Übersichtsaufnahmen sind ebenfalls kleinere Bereiche IR-spektroskopisch untersucht worden (Abb. 6). Hierdurch konnte ein noch detaillierteres Bild der Lipid-Protein-Verteilungssituation im Bereich der Intima gewonnen werden. Abb. 6A zeigt die entsprechende Aufnahmestelle des bereits in Abb. 5 dargestellten Gefäßquerschnittes. Unter Abb. 6A sind ebenfalls die mittels VCA- und HCA-bearbeiteten Gefäßausschnitte zu sehen, welche auch hier vor allem

im lumennahen Drittel der Intima, in Relation zu dem der Media zugewandten Drittel, das Vorhandensein größerer Lipideinlagerungen zeigen. Im Rahmen der VCA wurden die primär lipidhaltigen Komponenten ebenfalls in gelb, die proteinhaltigen in türkis dargestellt. In der HCA zeigen sich die intensivsten Lipideinlagerungen dunkelgrün, welche eben jenem Bereich nahe des Lumens zuzuordnen sind. Weiterhin wurde das proteinhaltige Areal der Media im Rahmen der HCA türkis markiert. Die hier grau und rot dargestellten Bereiche zeigen neben einem Lipid- ebenfalls einen Proteinanteil, wobei die Proteinmenge des grauen Areals im Vergleich zu der des roten deutlich überwiegt. Die entsprechend farbkodierten korrespondierenden Spektren sind in Abb. 6C zu finden. Ergänzend ist auch hier wieder die Lipidfärbung (Abb. 6B) zu betrachten, welche mit den Aussagen der spektroskopisch aufgenommenen und analysierten Bilder konform geht.

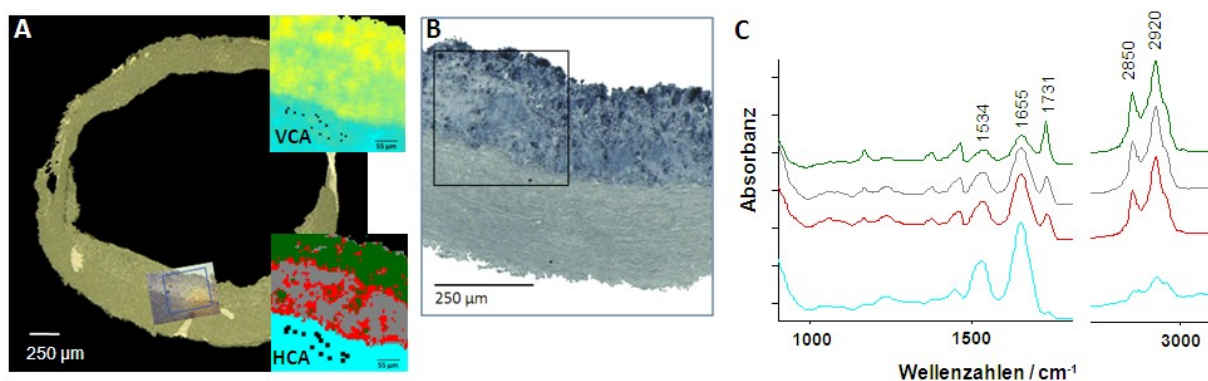


Abb. 6 Protein-Lipid-Verteilungsmuster nach IR-Mikrospektroskopie und Lipidfärbung eines Intimaausschnittes.

IR-spektroskopische Bildausschnitte (A) des in Abb. 3 gezeigten Gefäßquerschnittes nach VCA, HCA und die entsprechende Fettfärbung (B) zeigen ein klares Protein-Lipid-Verteilungsmuster. Die Proteinkomponente der spektroskopischen Bilder stellt sich blau dar, Lipide erscheinen in der VCA gelb, in der HCA sind die primär lipidhaltigen Komponenten in grün, rot und grau, entsprechend der korrespondierenden Spektren (C) dargestellt.

5.2.2 RAMAN-MIKROSKOPIE

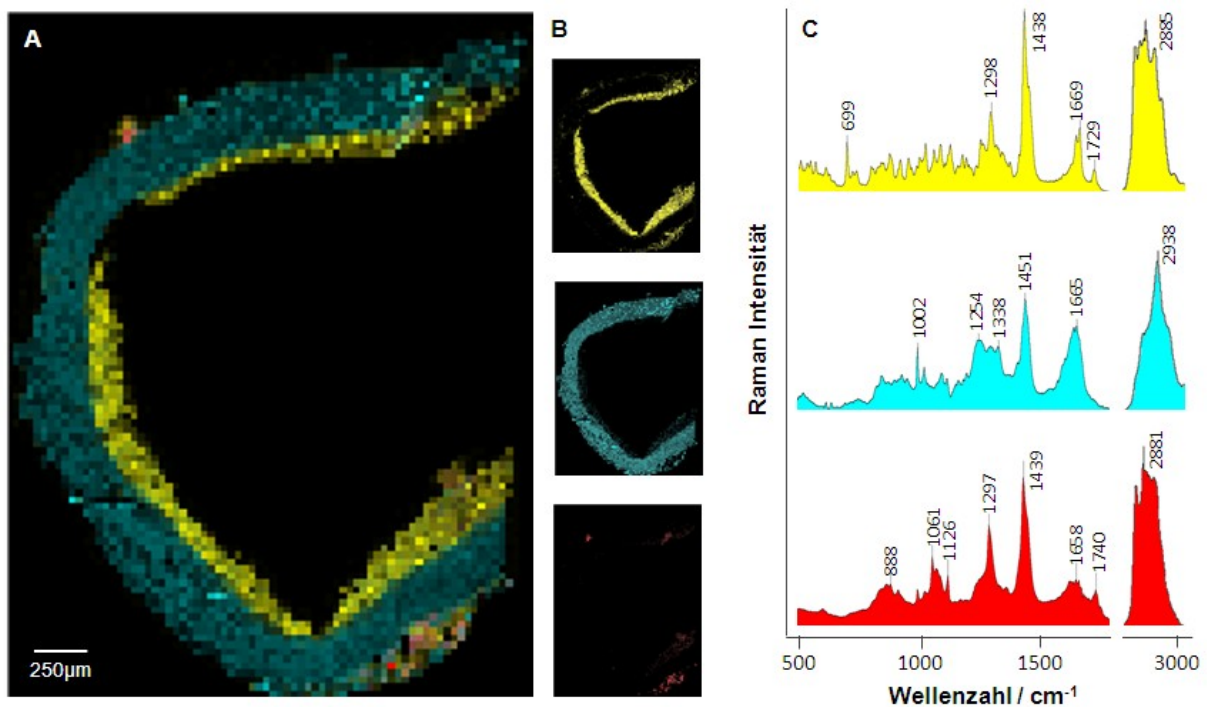


Abb. 7 Raman-spektroskopisch bearbeiteter Gefäßquerschnitt.

Thorakaler Aortenanschnitt als Raman-Mikroskopiebild nach VCA (A) sowie separat farbkodierte Darstellung der Hauptkomponenten (B) mit ihren korrespondierenden Spektren (C), wobei Cholesterinester gelb, Proteine türkis und die Phospholipid-/Triglyzerid-Mischkomponente rot gekennzeichnet sind. Adaptiert von Abb. 2 in Lattermann et al. 2013.

In Abb. 7 ist anteilig der Aortenquerschnitt zu sehen, welcher bereits FTIR-mikrospektroskopisch abgebildet und beurteilt wurde (siehe Abb. 4). Die Raman-Mikroskopie mit anschließender VCA ermöglichte hier, anders als die FTIR-Methode, eine Differenzierung von drei vorherrschenden Komponenten in der atherosklerotischen Läsion. Hier konnte im Speziellen eine weiterführende Differenzierung zwischen den vorliegenden Lipidfraktionen erreicht werden.

Neben der gemeinschaftlichen Darstellung der Hauptkomponenten sind diese in Abb. 7B separat aufgezeigt. Die hier gelb hervorgehobene Komponente zeigt ein vergleichbares Bandenmuster wie die mittels FTIR-Spektroskopie detektierten Cholesterinester. Raman-Bandenmaxima des gelb markierten Spektrums liegen bei 699, 1298, 1438, 1669, 1729 und 2885 cm^{-1} und zeigen somit eine Übereinstimmung mit dem Spektralmuster der Raman-Referenzsubstanz. Neben den Cholesterinestern

konnten kleinere Mengen an Phospholipiden und Triglyzeriden nachgewiesen werden, welche sich diskret innerhalb des Plaques, vor allem aber im perivaskulären Fettgewebe zeigten. Das hier aufgezeichnete charakteristische Bandenmuster, mit Peaks bei 1061, 1126, 1297, 1439, 1740 und 2881 cm^{-1} korrespondiert entsprechend mit dem der Referenzsubstanz. Die in der Abbildung blau dargestellten Bereiche entsprechen den gleichen Farbkodierungen der FTIR-Bilder. Für Kollagen typische Protein-Banden zeigen sich bei 850, 940, 1002, 1254, 1451, 1665 und 2938 cm^{-1} .

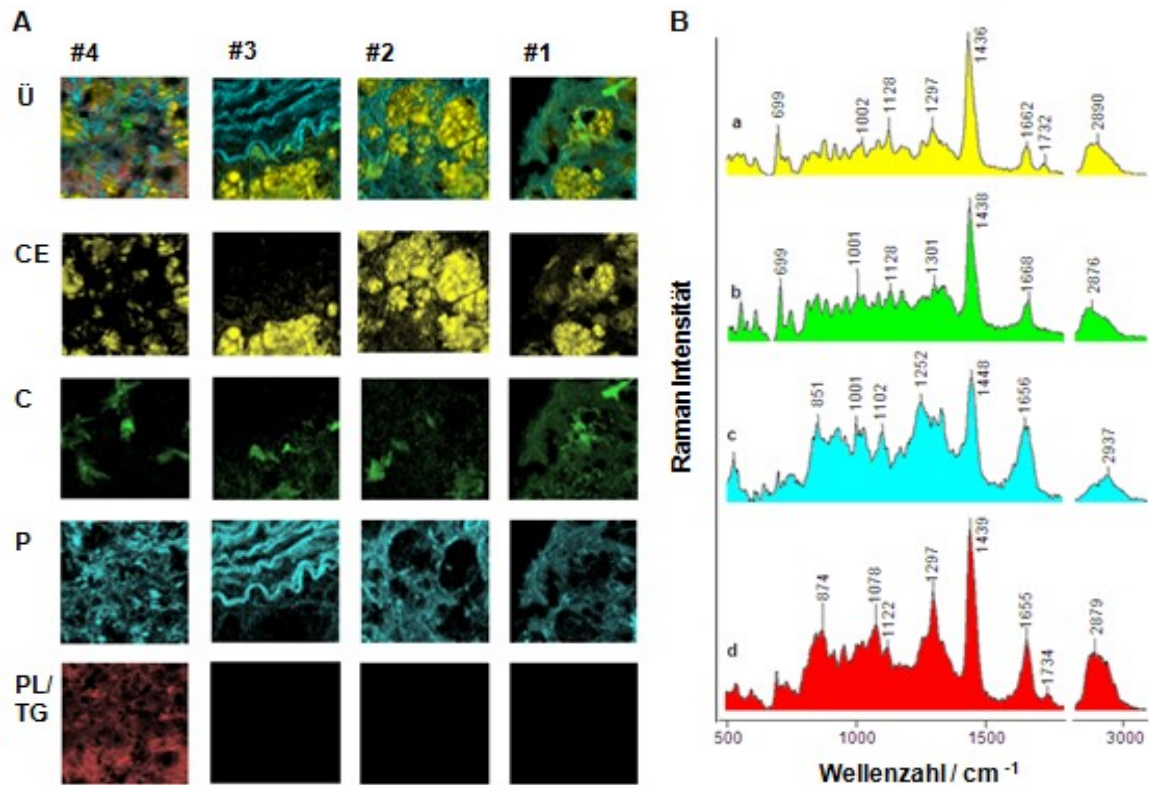
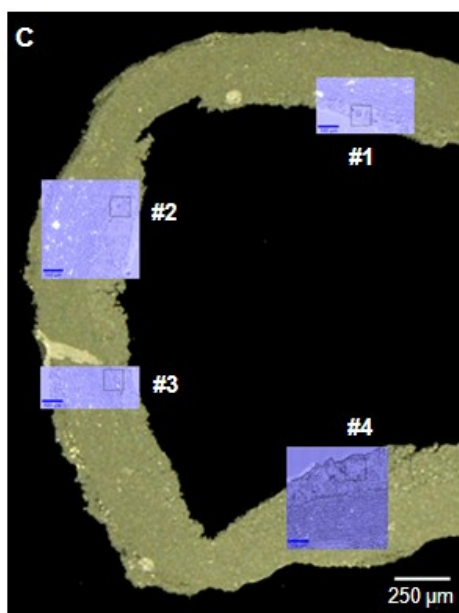


Abb. 8 Komponentenspezifische Darstellung verschiedener Plaqueareale mittels Raman-Mikrospektroskopie



Ungefärbter thorakaler Aortenquerschnitt mit ausgewählten Intimaarealen (C). Raman-Mikroskopiebilder nach VCA (A) mit Übersicht (Ü) und separierten Hauptkomponenten mit farbkodierten Spektren (B). Darstellung der Cholesterinester (CE) in gelb, Cholesterin (C) in grün, Proteine (P) in türkis, Phospholipide/Triglyzeride (PL/TG) in rot. Adaptiert von Abb. 3 in Lattermann et al. 2013

Von dem Aortenquerschnitt in Abb. 4 wurden vier intimale Areale herausgegriffen und mithilfe einer höheren lateralen Auflösung dargestellt. Die einzelnen Falschfarbenbilder (100 x 100 µm) in Abb. 4A beziehen sich auf die in Abb. 4C markierten Areale und zeigen das Resultat der Vertex-Komponenten-Analyse. Neben den Übersichtsbildern, welche alle detektierten Hauptkomponenten eines Areals enthalten, ist ebenfalls die separate Darstellung der jeweiligen Komponenten möglich gewesen. Im Rahmen dieser Untersuchungen, an atherosklerotisch veränderten Aortenquerschnitten, sind hauptsächlich Cholesterinester (CE), Cholesterin (C), Phospholipide/ Triglyzeride (PL/ TG) und Proteine (P) identifiziert worden. Die dazugehörigen Spektren wurden farbkodiert und mit den korrespondierenden Komponentenspektren abgebildet. Im Rahmen der Farbkodierung wurden Cholesterinester gelb, Cholesterin grün, die Phospholipid-/Triglyzerid-Mischkomponente rot und Proteine türkis hervorgehoben. Auf dem Übersichtsbild #1 der Abb. 8A ist ein an das Gefäßlumen grenzender Bereich der Intima zu erkennen, welcher dominant flächige Lipid-Akkumulationen enthält und von Protein-Strukturen umgeben ist. Als Hauptlipidkomponente konnten hierbei Cholesterinester identifiziert werden. In lumenferneren Bereichen der Intima (Abb. 8A(#2)) und in der Übergangsregion zwischen Intima und Media (Abb. 8A (#3)) sind ausgeprägte Lipidformationen, hauptsächlich bestehend aus Cholesterinestern, detektiert worden. Auch hier haben sich die identifizierten Proteinstrukturen vor allem um die Ansammlungen von Cholesterinestern herum gelagert. Das Übersichtsbild #3 der Abb. 8A zeigt nicht nur die Abgrenzung zwischen Intima und Media durch die LEI, sondern auch eine Separierung der lipidreichen intimalen Anteile von der Gefäßmedia, welche primär bindegewebige Strukturen und glatte Muskelzellen enthält. Kleinere Mengen an Cholesterin konnten ebenfalls in allen gescannten Bereichen der Intima dargestellt werden, wobei hier vorliegende kristalline Strukturen in Abb. 8A (#4) am besten zu erkennen und Cholesterinkristallen zuzuschreiben sind. Weiterhin konnte in dieser Übersicht auch eine Mischkomponente bestehend aus Phospholipiden und Triglyzeriden dargestellt werden.

5.3 MORPHOMETRIE

Mithilfe der EvG-Färbung (Abb. 9A) ließen sich Gefäßintima und –media gut voneinander abgrenzen, sodass auf Grundlage derer sowohl die Plaquefläche als auch die Intima-Media-Ratio (IMR) morphometrisch (Abb. 9B) bestimmt werden konnten. Exemplarisch wurde hier eine Plaque-Fläche von $0,83 \text{ mm}^2$ und eine IMR von 0,31 ermittelt, welche dem Gefäßquerschnitt in Abb. 5 entspricht. Basierend auf der Vertex-Komponenten-Analyse der FTIR-Bilder (Abb. 9C) konnten ebenfalls quantitative Aussagen bezüglich des Verhältnisses zwischen Lipid- und Proteinanteilen im Gefäßquerschnitt getroffen werden. Eine Lipid-Protein-Ratio (LPR) wurde bestimmt. Bei dem hier angesprochenen Querschnitt hat sich eine LPR von 0,17 ergeben. Diese (Abb. 9) und weitere Abbildungen mit den entsprechenden Werten sind in Abb. 10 zusammengefasst.

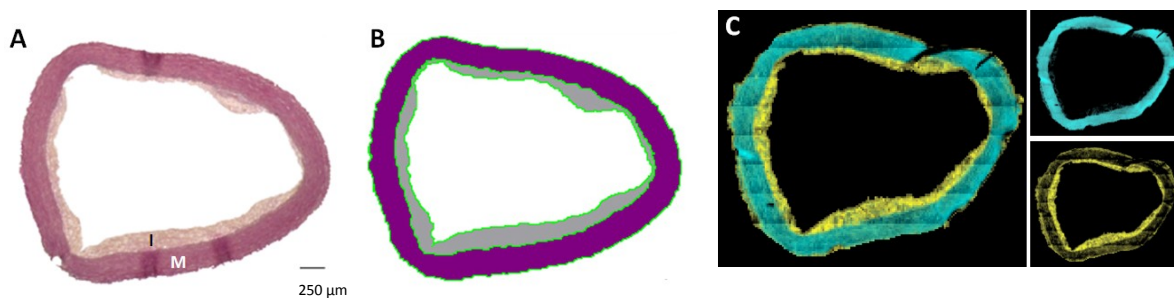


Abb. 9 Gegenüberstellung morphometrisch und spektroskopisch ermittelter Querschnittsflächen anhand der IMR und LPR.

Exemplarische Darstellung eines EvG-gefärbten Aortenquerschnitts (A). Das Areal von Intima (I) und Media (M) wurde morphometrisch (B) bestimmt und ergab eine Plaquefläche (grau) von $0,83 \text{ mm}^2$ und eine IMR von 0,31. Die via IR-Mikroskopie und VCA ermittelten Lipid- (gelb) und Protein(blau)-Anteile ergaben eine LPR von 0,17 und sind in C dargestellt.

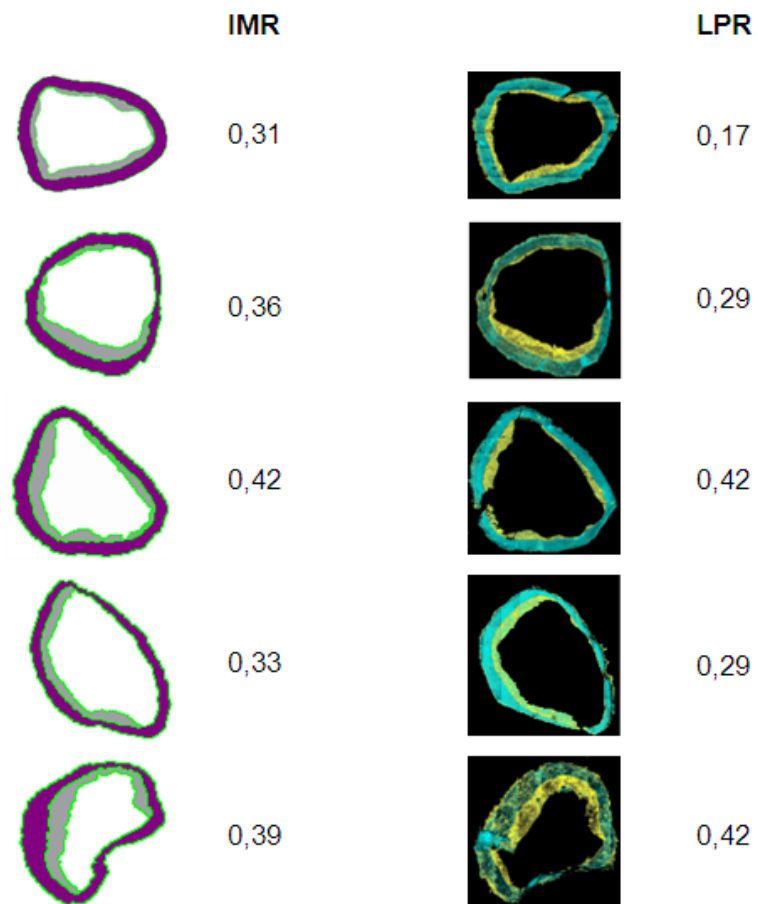


Abb. 10 Vergleich zwischen morphometrisch gemessener IMR und VCA-basierter LPR.
Die Anhand der Histologie bzw. der Falschfarbenbilder bestimmten Werte sind neben den einzelnen Bildern angeordnet. Adaptiert von Abb. 4 in Lattermann et al. 2013.

6 DISKUSSION

6.1 TIERMODELL

Im Rahmen zahlreicher Atherosklerose-Studien werden *NZW*-Kaninchen als Tiermodell genutzt. Die hier untersuchten Gefäßquerschnitte thorakaler Aorten stammen von männlichen *NZW*-Kaninchen, welche bereits innerhalb weniger Tage nach Beginn einer cholesterinreichen Diät laborchemisch nachweisbare Hypercholesterinämien entwickeln und somit über eine verstärkte Monozyten-Adhärenz am Gefäßendothel (Sary et al. 1994) für die Induktion atherosklerotischer Läsionen besonders empfindlich sind (Yanni 2004). Lipidablagerungen zeigten sich in den vorliegenden Untersuchungen hauptsächlich im subendothelialen Bereich der Intima und konnten in atherosklerotische Läsionen von Typ I - III (Sary et al. 1994) eingeteilt werden. Fortgeschrittenere Läsionstypen, wie sie z. B. das Atherom als Typ IV-Läsion darstellt, sind im Untersuchungsmaterial nicht aufgetreten. Stärker cholesterinangereicherte Diäten zeigten hohe Hepatotoxizitäts- und damit verbundene Sterberaten der Tiere sowie ein massives Inflammationsgeschehen (Yanni 2004), sodass im vorliegenden Tierversuch hierauf verzichtet wurde. Prolongierte niedrigdosierte Cholesterin-Diäten über mehrere Jahre (Adams et al. 1982), die Kombination von cholesterinreichen Diäten und Ballon-Katheter-Behandlungen (Aikawa et al. 1998) oder die Verwendung von transgenen Tieren (Fan et al. 2001) zeigten hingegen fortgeschrittene atherosklerotische Läsionen. Als Zielstellung der hier durchgeführten Untersuchungen ist die Möglichkeit der biochemischen Charakterisierung atherosklerotischer Plaquebestandteile zu sehen. Aus diesem Grund wurden keine weiteren, die Atherogenese vorantreibenden, Interventionen mit den Tieren durchgeführt. Die Lipiddetektion mittels Spektroskopiesonde limitierte die Auswahl der zu untersuchenden Gefäßquerschnitte aufgrund des Sondendiameters und deren Starrheit auf die thorakale Aorta.

6.2 INTERPRETATION DER ERGEBNISSE

Gegenstand zahlreicher wissenschaftlich-spektroskopischer Arbeiten auf dem Gebiet der Atherosklerose-Forschung stellen Detektionsmöglichkeiten instabiler Plaques bzw. deren Abgrenzung zu nicht ruptur-gefährdeten Gefäßwandverengungen dar (Manoharan et al. 1993; Matthäus et al. 2012a; Nogueira et al. 2005). Mithilfe der Molekülspektroskopie lassen sich anhand des molekülspezifischen Schwingungsverhaltens Rückschlüsse auf Molekülstrukturen ziehen. Dadurch ist eine biochemische Charakterisierung der entsprechenden Probenzusammensetzung möglich. Als Zielstellung der durchgeführten Untersuchungen ist die molekulare Beurteilung von atherosklerotischen Plaquebestandteilen zu sehen, welche anhand der IR- und Raman-Mikrospektroskopie detektiert und mit der Histopathologie verglichen wurden.

Für die vorliegenden Untersuchungen dienen zur Identifikation der einzelnen Plaquebestandteile repräsentative Spektren (Dreissig et al. 2009; Krafft et al. 2008; Krafft et al. 2005) von Cholesterin, eines Cholesterinesters, Triglyzerids und Kollagen als Referenz. Aufgrund der starken Ähnlichkeiten im spektralen Bandenmuster, welche zwischen kontraktilen Filamenten und den Bestandteilen der extrazellulären Bindegewebmatrix bestehen (Buschman et al. 2001a; Buschman et al. 2001b), konnten diese in den vorliegenden Untersuchungen zu einer proteinreichen Komponente zusammengefasst und mit dem Referenzspektrum des Kollagens verglichen werden. Neben Kollagen beinhaltet diese proteinreiche Komponente ebenfalls Elastin, Proteoglykane und die kontraktilen Filamente der glatten Muskulatur. Auch die Differenzierung zwischen Triglyzeriden und Phospholipiden, welche in den Proben eher spärlich zu finden waren, ist aufgrund der molekularen Ähnlichkeiten nicht trivial.

Die Ergebnisse der hier durchgeführten FTIR- und Raman-Mikrospektroskopien sind aufgrund ihrer unterschiedlich zugrundeliegenden physikalischen Prinzipien als einander ergänzend anzusehen. Dementsprechend weisen die detektierten Referenzspektren methodenspezifische Unterschiede in den Bandencharakteristika auf (siehe Abb. 3). So ist Raman-spektroskopisch eine höhere spektrale und örtliche Auflösung zugunsten der Substanzauflärung und Erkennung erreicht worden. Die Ortsauflösung beträgt hierbei 300 - 500 nm, weshalb eine sehr detaillierte Darstellung der aufgenommenen Bereiche möglich war. IR-spektroskopisch konnte

eine Ortsauflösung von etwa 10 µm erreicht und somit größere Bereiche in einer kürzeren Zeit beurteilt werden. Aufgrund der geringeren spektralen und örtlichen Auflösung konnten IR-spektroskopisch weniger differenzierte Aussagen hinsichtlich der molekularen Zusammensetzung und Histomorphologie getroffen werden. Aufgrund des Zeitfaktors und des verwendeten Mosaik-Modus zur Generierung der Übersichtsbilder konnte diese Methode allerdings optimal eingesetzt werden und in kurzer Zeit einen guten qualitativen und quantitativen Überblick bezüglich der vorhandenen Plaquesituation erbringen. Die sehr zeitaufwändige Raman-Mikroskopie wurde in diesen Untersuchungen ausschließlich zur qualitativen Beurteilung der Proben genutzt.

6.2.1 FTIR-MIKROSPEKTROSKOPIE

Die komplette Beurteilung der vorliegenden Gefäßquerschnitte gelang mithilfe eines Mosaikmodus im Rahmen des IR-Scans. IR-spektroskopisch aufgenommene Einzelbilder konnten hierunter zu einem Ganzen zusammengefügt und letztendlich der komplette Gefäßquerschnitt dargestellt und beurteilt werden. Die hierbei z. T. entstandenen streifigen Artefakte in den Übersichtsbildern sind somit keiner Substanzminderung, sondern der Aufnahmemethode zuzuschreiben. Anhand der Mikroskop-gekoppelten FTIR-Technologie ist eine Abgrenzung zwischen atherosklerotisch veränderten und unauffälligen Intimabereichen sowie eine differenzierte Betrachtung von Intima und Media der Aortenquerschnitte möglich gewesen (Abb. 4, Abb. 5). Ebenfalls erscheint durch diese Methode eine biochemische Beurteilung unterschiedlichster atherosklerotischer Läsionen möglich. Eine Differenzierung zwischen instabilen Plaques, mit Lipidkern und dünner fibrotischer Kappe, und stabilen Läsionen, mit einem hohen Anteil an extrazellulärem Bindegewebe, scheint hiermit ebenfalls durchführbar. Die Unterscheidung beider Gefäßwandschichten gelang durch eine getrennte Darstellung der lipid- und proteinreichen Gefäßwandkomponenten, welche nach erfolgter IR-Bildgebung im Rahmen der multivariaten Datenanalyse mittels VCA als Falschfarbenbilder dargestellt werden konnten. Die farbkodierten Abbildungen enthalten fettreiche gelb und proteinreiche türkis markierte Areale. Spektroskopisch zeigt die fettreiche Komponente in den IR-Bildern das Bandenmuster von verestertem Cholesterin an. Weitere Lipidfraktionen, wie unverestertes Cholesterin, Phospholipide oder

Triglyzeride konnten anhand der IR-Spektroskopie und den nachgeschalteten multivariaten Datenanalysen nicht unterschieden werden. Eine fehlende Differenzierung, auch nach Einsatz höherer Klassen bzw. Cluster in der VCA und HCA, ist zum einen auf die geringere spektrale und örtliche Auflösung der Methode und zum anderen auf den prozentual geringer vorhandenen reinen Cholesterinanteil in atherosklerotischen Plaques zurückzuführen. Cholesterin, mit einem Anteil von 10 - 30 %, ist im Vergleich zu der quantitativ am stärksten vorliegenden Lipidfraktion, den Cholesterinestern mit 45 - 78 %, deutlich in der Minderheit (Weinmann et al. 1998). Anhand der in Abb. 4 dargestellten Querschnitte ist eine eindeutige Differenzierung der Gefäßwandschichten möglich. Sowohl die gesonderte Darstellung von kollagenen und elastischen Fasern mittels EvG-Färbung (Abb. 4A) als auch die spektroskopische Unterscheidung von protein- und lipidreichen Bestandteilen (Abb. 4B) erlauben eine Unterscheidung der einzelnen Schichten. Das aufgeführte Farbmuster wurde im Rahmen der stattgehabten IR-spektroskopischen Untersuchungen beibehalten. Helligkeitsunterschiede weisen auf Konzentrationsdifferenzen der enthaltenen Komponenten hin, wobei ein hellerer Farbton einer höheren Konzentration und ein gedämpfter Farbton entsprechend einer verminderten Konzentration des Probenbestandteils zuzuschreiben ist. In Abb. 4B zeigt sich eine insgesamt eher homogene Lipiddurchdrungenheit der atherosklerotisch veränderten Bereiche, wohingegen in Abb. 5A eine Lipidanreicherung, vor allem im oberflächlichen endothelnahen Bereich der Intima deutlich wird. Im Rahmen der initiierten Hypercholesterinämie kommt es nachfolgend zu einer gesteigerten Monozytenadhärenz am Gefäßendothel. Ebenso wird die Umwandlung und Akkumulation von Makrophagen hierdurch getriggert (Stary et al. 1994). Durch die massive Aufnahme von LDL-abhängigem Cholesterin über Scavenger-Rezeptoren in die Makrophagen entstehen letztendlich makrophagenabhängige Schaumzellen (Glass & Witztum 2001). Mithilfe von Lipidfärbungen, wie der Sudanschwarz- oder Ölrot-Färbung, lassen sich diese Fette und fettartige Substanzen bereits frühzeitig histologisch darstellen (P Wrobel et al. 2011). Hierbei finden sich initial, im oberflächennahen subendothelialen Bereich der Intima, isolierte Grüppchen von Makrophagen mit vakuolären Lipideinschlüssen (Small 1988; Stary 1989). Neben einer adaptiven Verdickung der Intima sammeln sich Schaumzellen im weiteren Verlauf auch in tiefer gelegenen intimalen Bereichen an (Small 1988; Stary et al. 1994). Entsprechend dieser Gegebenheiten sind die

unterschiedlichen Lipidverteilungen in den beschriebenen IR-Übersichtsbildern (Abb. 4A, Abb. 5A) zu deuten. Im Rahmen der Progression von initialen zu komplexen atherosklerotischen Läsionen werden zusätzlich glatte Muskelzellen der Media Richtung Intima mobilisiert, welche proliferieren, via Scavenger-Rezeptoren ebenfalls LDL-abhängiges Cholesterin aufnehmen und sich entsprechend zu Schaumzellen weiterentwickeln (Glass & Witztum 2001). Vorangeschrittene Läsionen, im Sinne von atheromatösen Veränderungen, konnten aus den bereits beschriebenen Gründen in den bearbeiteten Querschnitten nicht detektiert werden. Neben den in der Intima spektroskopisch darstellbaren Lipiden sind hier proteinreiche Faserkomponenten als strukturgebend anzusehen. Weniger von Lipiden dominierte Bereiche fallen als grünliche Areale in den Falschfarbenbildern auf. Im Übergangsbereich der Gefäßintima zur Media, an der LEI, ist anhand der spektroskopischen Bildgebung ein abrupter Wechsel der intimal dominierenden Lipidkomponente in eine, von glatten Muskelzellen und extrazellulärer Bindegewebsmatrix beherrschte Proteinkomponente festzustellen. Dieser abrupte Wechsel zeigte sich ebenfalls in den durchgeführten HCA der Übersichtsbilder (Abb. 5B). Neben einer konkreten Abgrenzung von protein- und lipidreichen Arealen ließen sich auch Mischkomponenten darstellen, welche in Abb. 5A als grünlicher Bereich imponieren und auch in Abb. 5B farblich abgrenzbar erscheinen. Eine histologische Aufbereitung der Parallelschnitte mittels EvG- und Sudanfärbung wurde hier vergleichend gegenüber gestellt. Auch wenn anhand der Parallelschnitte keine hundertprozentige Übereinstimmung zu erwarten ist, zeigt das Sudanschwarzgefärbte Plaqueareal in Abb. 5D eine gute morphologische Vereinbarkeit mit der in Abb. 5A und B dargestellten IR-Bildgebung. Die Lipidfärbung weist oberflächlich im subendothelialen Bereich der Intima zahlreich aufzufindende Lipidablagerungen, vorwiegend im Sinne von lipidspeichernden Schaumzellen auf. Verglichen mit Abb. 5A entsprechen die schwarzgefärbten Strukturen dem hellgelben Saum der VCA und annähernd dem dunkelgrünen Bereich der HCA in Abb. 5B. In allen Darstellungen zeigte sich eine Verminderung des Lipidgehaltes in Richtung der Media. Mittels der hier angewendeten Cluster-Analyse konnte im Bereich der LEI ein blauer Saum von Intima und Media abgegrenzt werden, was auf den hohen Anteil an hier vorliegenden elastischen Fasern zurückzuführen ist. Eine ähnliche Vergleichbarkeit von IR-Bildgebung und den durchgeführten Lipidfärbungen der übrigen Übersichtsbilder bestätigte sich. Als qualitativ hochwertiger sind die IR-spektroskopisch

durchgeführten Einzelbildmessungen anzusehen. Hierbei wurden in atherosklerotisch veränderten Arealen der Übersichtsbilder jeweils drei Einzelbildmessungen angelegt, welche sich vom oberflächlichen Bereich der Intima bis in die Media erstreckten. Als exemplarische Darstellung dient hierbei ein Auszug aus dem bereits in Abb. 5 gezeigten Gefäßquerschnitt. In Abb. 6 ist die IR-Bildgebung mittels VCA und HCA der Lipidfärbung wieder entsprechend gegenübergestellt. Die IR-spektroskopischen Aufnahmen zeigen hier eine noch deutlichere Verteilung der eingelagerten Lipide als dies in den Übersichtsbildern möglich war. Ein subendothelial vorliegender Lipidsaum ist nur oberflächlich nachzuweisen. Die hier zum Teil auch konfluierenden Lipidansammlungen rarefizieren sich in Richtung der LEI zunehmend und sind innerhalb der Media nicht mehr aufzufinden. Unter Abb. 6A korrespondieren die mittels VCA und HCA generierten Bilder mit der Sudanschwarz-gefärbten Histologie (Abb. 6B). Vor allem lumennah sind Lipidakkumulationen kugeligter Struktur nachzuweisen, welche am ehesten mit dem Vorliegen von Schaumzellen im Zusammenhang stehen (Stary et al. 1994). In tieferen Schichten der Intima konnten ebenfalls Lipidablagerungen detektiert werden, welche quantitativ aber geringer ausfielen und in den IR-spektroskopisch generierten Bildern die Intima zweigeteilt aussehen lassen (Abb. 6A). Mittels der hier dargestellten IR-Bildgebung der Gefäßquerschnitte ist eine konkrete Einteilung in den vorliegenden atherosklerotischen Läsionstyp möglich. Bezugnehmend auf die Zeitdauer der durchgeführten cholesterinreichen Diät und das Alter der Tiere konnten in den untersuchten Gefäßquerschnitten von initialen Läsionen bis hin zu Intermediärläsionen atherosklerotische Veränderungen festgestellt werden.

6.2.2 RAMAN-MIKROSPEKTROSKOPIE

Neben den IR-spektroskopischen Untersuchungen wurden die vorliegenden Gefäßquerschnitte ebenfalls mithilfe der Raman-Mikrospektroskopie untersucht. Diese etwas zeitaufwändigere Methode garantiert ein besseres örtliches und räumliches Auflösungsvermögen, wovon sich differenziertere Einblicke in die Lipidkomposition der vorhandenen Plaques und eine entsprechende Strukturaufklärung versprochen wurden. Neben den Cholesterinestern, welche mit der überwiegenden Mehrheit als Hauptlipidkomponente zu betrachten sind, galt es

Raman-spektroskopisch die bisher nicht detektierten Fraktionen von Cholesterin, Phospholipiden und Triglyzeriden darzustellen. Cholesterin, welches mit einem Anteil von 10 - 30 % an atherosklerotischen Läsionen beteiligt ist (Weinmann et al. 1998), überwiegt noch die in den Plaques durchschnittlich vorhandenen Anteile an Phospholipiden und Triglyzeriden. Diese nehmen mit 9 - 16 bzw. 2 - 7% einen hinteren Stellenwert bezüglich der Quantität vorhandener Lipidkomponenten ein (D. E. Vance and J. E. Vance 2002, Small 1988). Die große Streubreite der hier angegebenen Prozente ist auf unterschiedliche Konzentrationen entsprechend des vorliegenden Läsionstyps zurückzuführen. So kommt es in frühen Stadien der Atherosklerose zu einer starken Anreicherung von Cholesterinestern, welche hier nahezu eine 80-prozentige Mehrheit unter den Lipiden erreichen können. In fortgeschrittenen Läsionen hat sich demgegenüber eine Abnahme der Cholesterinesterfraktion auf bis zu 45 % und eine Zunahme des Cholesterins mit einem Anteil von bis zu 30 % an dem Gesamtlipidaufkommen in atherosklerotischen Plaques gezeigt (Katz et al. 1976; Weinmann et al. 1998). Phospholipide stellen die größte Fraktion der Membranlipide dar und wiesen im Gehaltsvergleich in Zellen atherosklerotischer Läsionen und Zellen ungeschädigter Intimaareale keine wesentlichen Abweichungen voneinander auf (Insull et al. 1966). Im Gegensatz hierzu haben sich in nicht atherosklerotisch umgewandelten Gefäßwandbereichen annähernd keine Triglyzeride auffinden lassen (Mukhin et al. 1991). Bezugnehmend auf die IR-spektroskopische Bildgebung wurden die vorliegenden Querschnitte ebenfalls Raman-spektroskopisch auf ihre Zusammensetzung hin vergleichend untersucht. Der bereits in Abb. 4, im Rahmen der IR-Bildgebung, dargestellte Gefäßquerschnitt ist nun auch in Abb. 7 als Probe für die Raman-Mikrospektroskopie erneut verwendet worden, um einen optimalen Vergleich beider Methoden zu ermöglichen. Neben den IR-spektroskopisch detektierten Protein- und Cholesterinester-Spektren, konnten mithilfe der Raman-Technologie ebenfalls kleinere Phospholipid-, Triglyzeridvorkommen detektiert und deren Spektralinformation dargestellt werden, wobei es sich auch hier um ein Mischspektrum handelt. Zur besseren Übersicht besteht im Rahmen der VCA die Möglichkeit, alle herausgefilterten Komponenten der Übersichtlichkeit wegen einzeln darzustellen (Abb. 7B). Das hier generierte Raman-Bild besteht nicht aus zusammengesetzten Mosaiken, wie es bei den IR-Bildern notwendig war, sondern aus mehreren tausend Einzelpunktmessungen, welche eine verlängerte Messzeit mit

sich brachten. Im Vergleich der beiden Übersichtsbilder (Abb. 4, Abb. 7) fällt ein ähnliches Verteilungsmusters der eingelagerten Lipide auf, welches ebenfalls mit der Histopathologie im Einklang steht. Beide mikrospektroskopischen Aufnahmen wurden an demselben Querschnitt generiert. Zur übersichtlicheren Darstellung sind im Falle des IR-Bildes (Abb. 4A) die am Gefäßquerschnitt noch vorhandenen Anteile der Adventitia weggeschnitten worden. Dies ist bei der Bearbeitung des Raman-Bildes nicht möglich gewesen und somit hier noch ansatzweise zu erkennen. Neben den beiden detektierten Hauptbestandteilen, den Proteinen und Cholesterinestern, ist es Raman-spektroskopisch gelungen, eine Mischkomponente von Phospholipiden und Triglyzeriden in ihrer Verteilung darzustellen. Hierbei auffällig erscheinen größere Anteile von Triglyzeriden in der Adventitia, was sich zum einen mit dem bekannt hohen Anteil von Triglyzeriden in Adipozyten der Adventitia deckt (Small 1988) und zum anderen auch bereits Raman-spektroskopisch untersucht wurde. Bei diesen Untersuchungen zeigten sich ähnliche Spektren, wie die hier generierten (Buschman et al. 2001a; Buschman et al. 2001b). Die Menge an Triglyzeriden in atherosklerotischen Typ-II-Läsionen, wie sie hier hauptsächlich vorliegen, werden als sehr gering eingestuft (D. E. Vance and J. E. Vance 2002). Vom Verteilungsmuster ist anzunehmen, dass es sich bei dem überwiegenden Anteil der in Abb. 7 rot dargestellten Komponente der Adventitia um Triglyzeride in Adipozyten handelt, wobei das Verteilungsverhalten eben jener intimalen Komponente eher an Phospholipide erinnert. Da sich Phospholipide und Triglyzeride in ihren funktionellen Gruppen sehr ähnlich sind ist eine genaue Trennung aktuell noch nicht möglich gewesen und so wird in dieser Arbeit vor dem oben angegebenen Hintergrund von Mischkomponenten gesprochen. Um zu überprüfen, inwieweit sich die Messung mit vorhandener Adventitia auf die Detektion dieser Phospholipid/ Triglyzerid-Komponente ausgewirkt hat, wurde dieser Querschnitt im Nachfolgenden mit adventitialen Anteilen IR-spektroskopisch beurteilt. Dies erbrachte allerdings keine Änderung hinsichtlich der detektierbaren Hauptbestandteile. Cholesterinester zeigten sich sowohl in den IR- als auch in den Raman-Aufnahmen als Hauptlipidkomponente. Diese vor allem vakuolär gespeicherte Lipidfraktion ließ sich morphologisch besonders deutlich in den kleineren Raman-Bildern der Abb. 8A darstellen. Auf das Vorhandensein von Schaumzellen weisen die hier sichtbaren schollig zusammengelagerten Cholesterinester hin (Rosenfeld et al. 1991). Auch initiale atherosklerotische Läsionen zeigen bereits gruppierte Ansammlungen von

lipidbeladenen Makrophagen auf (Glass & Witztum 2001; Stary et al. 1994). Im Verlauf der Atherogenese kommt es zu einer verstärkten endothelialen Monozytenadhäsion, mit daraufhin gesteigertem subendotheliale Auftreten von Makrophagen und Schaumzellen (Hansson 2005). Im vorangeschrittenen Stadium werden auch glatte Muskelzellen der Media zur Immigration in die Gefäßintima mobilisiert, welche hier ebenfalls Lipide über vorhandene Scavenger-Rezeptoren einlagern können und zu Schaumzellen degradiert werden (Hansson 2005; Stary et al. 1994). Gering lipidbeladene Makrophagen finden sich eher in den oberflächlichen subendothelialen Schichten der Intima, wohingegen reich mit vakuolär eingelagerten Cholesterolestern versehene Schaumzellen vor allem in tieferen intimalen Bereichen zu finden sind (Stary et al. 1995; Stary et al. 1994). In den Abbildungen unter 8A sind Schaumzellen sowohl im lumennahen Bereich der Abb. 8A (#1) als auch an der direkten Grenze #3, der LEI, zur Media zu finden. Die Bereiche, welche hier besonders stark von Schaumzellen ausgefüllt sind, zeigen ein verdrängendes Verhalten hinsichtlich der vorliegenden strukturgebenden Proteine. Die alleinig aufgezeigten Proteinstrukturen machen deutlich, dass eine vermehrte Anzahl an Schaumzellen den subendothelialen Raum bereits deutlich auflockert und somit bereits den Weg für instabile Läsionen ebnet. Neben den in Schaumzellen enthaltenen Cholesterinestern ist das gleichzeitige Auftreten von Cholesterinkristallen möglich (Kellner-Weibel et al. 1999). Aufgrund der fehlenden Verwertbarkeit der massenhaft gespeicherten Cholesterinester durch die Schaumzellen fällt Cholesterin intrazellulär aus und bildet kristalline Strukturen. Ebenfalls kommt es durch verstärkte Cholesterineinlagerungen in den Biomembranen zur Kristallbildung (Small 1988). In Form und Größe unterschiedliche Cholesterinkristalle sind in den Abbildungen unter 8A zu finden. Zusammen mit apoptoseauslösenden Perforinen kommt es im Progress der Atherogenese zum Austritt der gespeicherten Lipidfraktionen, welche sich nun nach extrazellulär ergießen, mit dem Inhalt anderer apoptotischer Schaumzellen konfluieren und intraarterielle Lipidformationen bilden können. In Abb. 8A (#3) erscheint der Anteil an Cholesterinestern bereits miteinander in Verbindung stehend. Ebenfalls zeigen sich innerhalb der Cholesterinestermasse kleinere Cholesterinkristalle, welche der LEI anliegen. Nach dem Auftreten dieser Kristalle kommt es in der Regel zu einem Größenwachstum der Plaque und dem darin befindlichen Lipidkern (Kellner-Weibel et al. 1999). In atherosklerotischen Läsionen mit einem hohen extrazellulär vorliegenden Lipidanteil und einer dünnen fibrösen

Deckplatte sind mechanisch instabile Plaques zu sehen (Stary et al. 1995), welche die Entstehung lebensbedrohlicher Komplikationen unterstützen (Naghavi et al. 2003b). Abb. 8A #4 zeigt deutliche Einschlüsse der Mischkomponente aus Phospholipiden und Triglyzeriden. Da das Verteilungsverhalten dem hier vorhandenen Proteinmuster sehr ähnlich sieht, kommen als detektierte Verbindungen primär die Phospholipide in Frage, welche als wesentlicher Bestandteil von Biomembranen fungieren. Aufgrund der bereits erläuterten Begebenheiten konnte bei diesen Untersuchungen nicht die volle Bandbreite an atherosklerotischen Läsionen dargestellt werden. Die exemplarisch ausgewählten IR- und Raman-Bilder lassen jedoch keinen Zweifel an der Potenz der hier vorgestellten schwingungsspektroskopischen Methoden hinsichtlich der Detektion von instabilen Plaques bzw. der Differenzierung von vulnerablen und nicht vulnerablen Läsionstypen.

6.3 MORPHOMETRIE

Als Atherosklerose-Indikator wird häufig das Intima-Media-Verhältnis ermittelt, wobei die Flächen der inneren und mittleren Gefäßwandschicht morphometrisch abgemessen und ins Verhältnis gesetzt werden müssen (de Groot et al. 2008). Neben der histologischen Bestimmung der IMR kann die Ausmessung von Intima und Media ebenfalls sonographisch, aber auch im Rahmen von invasiven Methoden, wie dem IVUS oder der OCT durchgeführt werden (Kovarnik et al. 2013; Tsioufis et al. 2012). Für eine gute Differenzierung der beiden Gefäßwandschichten am histologischen Präparat sorgt die EvG-Färbung. Anhand der protein- und lipidreichen Komponenten der Gefäßquerschnitte konnte auch spektroskopisch eine Differenzierung von Intima und Media am ungefärbten Präparat vorgenommen werden. Ähnlich der Intima-Media-Ratio (IMR) wurde eine Lipid-Protein-Ratio (LPR) aller Querschnitte angelegt. Da beim Herstellungsprozess die Proben für die spektroskopischen Untersuchungen, aufgrund von zu messenden Artefakten, nicht komplett in TissueTek eingebettet werden konnten, verkomplizierte sich das Schneiden der Gefäßquerschnitte sehr stark, sodass in Abb. 10 nur eine kleinere Auswahl von annähernd in ihrer Form kompletter Querschnitte zu sehen ist. Die erhaltenen Werte der LPR, welche im Mittel 0,318 betrugen, waren im Vergleich zu den Mittelwerten der IMR mit 0,362 etwas geringer. Da sich die proteinhaltigen Komponenten nicht ausschließlich auf die Media beschränken, sondern auch strukturegebend für die Intima zu sehen sind, ergeben sich diese von der IMR leicht abweichende Werte. Visuell ist eine klare Abgrenzung beider Gefäßwandschichten möglich, wobei die beschriebenen Ratios Informationen bezüglich des Atherosklerose-Prozesses liefern. Je größer die Fläche der Intima bzw. deren Lipidreichhaltigkeit, desto größer ist die Gefahr eines in Zukunft auftretenden ischämischen Events (Falk et al. 2011).

6.4 AUSBLICK

Die Schwingungsspektroskopie eignet sich hervorragend zur Strukturaufklärung und biochemischen Charakterisierung von Gewebe und Zellen (Cicchi et al. 2013; Lattermann et al. 2013; Miljković et al. 2010).

Die IR-Mikrospektroskopie stellt hierbei eine potente Methode zur qualitativen und quantitativen Charakterisierung von Plaquebestandteilen dar. Der im Rahmen von IR-mikrospektroskopischen Untersuchungen entstehende Zeitaufwand beim Generieren von Übersichtsbildern ist gering, sodass zukünftig ein Einzug dieser Methode in die klinische Diagnostik durchaus denkbar ist. Hierfür sollten allerdings entsprechende Programme, in Kooperation von Klinikern und Naturwissenschaftlern, trainiert werden, welche die Anwendung und Auswertung für den klinischen Alltag erleichtern. Multiple und langandauernde FärbeprozEDUREN könnten hiermit reduziert bzw. verkürzt werden. Ebenfalls besteht die Möglichkeit alle spektroskopischen Untersuchungen an derselben ungefärbten Histologie, mit eventuell nachgeschalteter HE-Färbung vergleichend durchzuführen. Somit würden zahlreich angefertigte Parallelschnitte überflüssig und ein Vergleich der spektroskopisch generierten Falschfarbenbilder mit derselben, aber dennoch gefärbten Histologie möglich. Auch der LPR könnte zukünftig eine gesteigerte Bedeutung zukommen, da letztendlich die fettreichen Plaques diejenigen darstellen, welche es früh zu erkennen und entsprechend zu therapieren gilt. Die im Rahmen der Anschaffung entstehenden hohen Kosten sowie die Verwendung von ebenfalls kostspieligeren IR-transparenten bzw. -reflektierenden Objektträgern erscheinen primär nachteilig. Die beschriebenen Kosten sind allerdings nur einmalig zu rechnen und auch die Objektträger können nach entsprechender Reinigung erneut verwendet werden. Im Bezug auf die Bildgenerierung ist die Raman-Mikrospektroskopie als eine sehr zeitintensive Methode zu sehen. Besonders vielversprechend erscheint die Raman-Spektroskopie allerdings bezugnehmend auf die *in-vivo*-Katheter-Diagnostik. Mithilfe von *in vivo* durchgeführten Spektroskopie-Messungen könnte erstmals eine konkrete Unterscheidung von stabilen und instabilen Plaques sicher durchgeführt werden. Verschiedene Studien existieren, in welchen anhand unterschiedlich aufgebauter Raman-Sonden Spektren *in vivo*, im Rahmen von Endarteriektomien der A. carotis bzw. bei femoralen Bypass-Operationen, generiert werden konnten (Sćepanović et al. 2011). Ähnliche Untersuchungen erfolgten bereits in früheren Jahren mithilfe der

Fluoreszenz-Spektroskopie (Marcu et al. 2009). Die in allen Fällen durchgeführten Messungen fanden innerhalb ligierter, mit 0,9%igem NaCl perfundierter Gefäße und ohne kombinierte Bildgebung statt, sodass sie speziell für Herz-Katheter-Untersuchungen nicht geeignet wären. In der Arbeitsgruppe am IPHT Jena konnten Raman-Spektren von Kaninchen-Aorten bereits *in vivo*, bei fortbestehender Perfusion, generiert werden (Matthäus et al. 2012a). Ansteigende Lipidkonsignale wurden hier beim Zurückziehen der Sonde von der Aortenbifurkation in Richtung des Aortenbogens verzeichnet. Eine Kopplung der Spektroskopiesonde an vorhandene bildgebende Verfahren, wie den IVUS oder die OCT, erscheint für eine ideale Beurteilung der Plaquekomponenten allerdings notwendig. Weitere *must-have*-Kriterien an die Sonde bestehen in einem möglichst kleinen Sondendurchmesser von ≤ 1 mm und einer gesteigerten Flexibilität. Ein Lumen innerhalb der Spektroskopiesonde erscheint ebenfalls zur Führung derselben angebracht. Die Messungen sollten möglichst von kurzer Dauer sein und ein gutes Signal-Rausch-Verhältnis aufweisen (van de Poll et al. 2002). Eine verbesserte Sondenqualität mit den beschriebenen Qualitäten ist essentiell, um beispielsweise Endarterien und Gefäße mit stenosierten Durchmesser sowohl passieren als auch beurteilen zu können.

7 SCHLUSSFOLGERUNGEN

Die Mikrospektroskopie stellt eine potentielle Methode zur Detektion und Differenzierung molekularer Gewebeveränderungen dar (Haka et al. 2011; Lattermann et al. 2013), weshalb eine derartige Diagnostik den Untersucher bereits in frühen Krankheitsstadien alarmieren und somit die Therapie und Prognose wesentlich beeinflussen kann. Die mittels FTIR- und Raman-Mikrospektroskopie erzielten Darstellungen ermöglichen sowohl eine biochemische als auch eine strukturelle Differenzierung zwischen unterschiedlichen atherosklerotischen Plaquekomponenten, welche sich als vereinbar mit den entsprechenden Histopathologien zeigten. Aufgrund der sehr viel höheren Ortsauflösung der Raman-Mikrospektroskopie konnten die vorliegenden Gewebestrukturen hiermit besser identifiziert und genauer subklassifiziert werden als mit der IR-Methode. Eine Unterscheidung von stabilen und instabilen Plaques erscheint somit mikrospektroskopisch möglich. Diese Untersuchungen ermöglichen ebenfalls die Beantwortung einer Vielzahl von Fragestellungen anhand eines einzigen Präparates, ohne zahlreich und zeitintensiv durchgeführte histologische Färbungen. Auch kostspielige Immunhistochemien, wie z. B. die Bestimmung von CD 68 als zellulären Marker für Makrophagen, können hierdurch zumindest teilweise ersetzt werden. Die Herstellung multipler Parallelschnitte erscheint somit reduzierbar und alle, anhand der Spektralinformationen, generierten Falschfarbenbilder sowie eine vergleichende histologische Färbung können an derselben Probe durchgeführt werden. Die Übersichtlichkeit bezüglich der detektierten Gewebekomponenten in den unterschiedlich ausgewerteten Präparaten bleibt entsprechend erhalten. Ebenfalls besteht die Möglichkeit der separaten Darstellung aller detektierten bzw. interessierenden Komponenten, wodurch ergänzend zur Übersichtlichkeit beigetragen wird. Da mithilfe der Mikrospektroskopie eine Untersuchung der Präparate auf molekularer Ebene ermöglicht wird, ist eine Verbesserung der diagnostischen Genauigkeit und der Aussagekraft der histologischen Präparate anzunehmen. Weiterhin besteht hiermit die Option, gezielt nach charakteristischen bzw. in ihrer Struktur veränderten Verbindungen zu suchen. Basierend auf dem verwendeten VCA-Algorithmus konnte in den hier vorliegenden Untersuchungen eine Quantifizierung der vorhandenen Komponenten durchgeführt werden. Um objektive Aussagen bezüglich der vorliegenden Histologie erhalten zu können, erscheint eine entsprechend programmierte und trainierte Software im Klinikalltag sinnvoll, welche

dem Untersucher die Auswertung der Spektralinformationen erleichtert und das Präparat in eine, von bereits zuvor festgelegten Klassen einteilt. Zur Erkennung spezifischer Verbindungen bzw. pathologischer Muster können ebenfalls spektrale Datenbanken genutzt werden. Somit ist auch eine Eingliederung der Mikrospektroskopie in den klinischen Alltag denkbar. Eine Schwierigkeit chemischer Natur stellt bei diesen Untersuchungen die Unterscheidung zwischen den in ihrer Struktur sehr ähnlichen Verbindungen dar, wie z. B. die Differenzierung zwischen Phospholipiden und Triglyzeriden oder aber die verschiedenster Cholesterinester. Bezugnehmend auf die vorliegenden Untersuchungen ist aktuell von besonderem Interesse, bestehende Veränderungen der Gefäßintima entsprechenden atherosklerotischen Läsionstypen zuzuschreiben und dementsprechend zwischen stabilen und instabilen Plaques *in vivo* differenzieren zu können. Da die FTIR-Spektroskopie unter der starken Absorption wasserhaltiger Proben leidet und nur eine geringe Eindringtiefe in natives Gewebe zulässt, kommt die Raman-Spektroskopie als bevorzugte Methode für *in vivo* durchzuführende Echtzeitmessungen in Frage. Momentan sind diese Art von Untersuchungen am Lebenden nur bedingt und ausschließlich im Rahmen von Studienprotokollen durchführbar (Matthäus et al. 2012a; Sćepanović et al. 2011). Weiterentwicklungen, vor allem im Bereich der Sondentechnologie sind zwingend notwendig, um zum einen den direkten Vergleich zwischen detektierten Spektren und der vorhandenen Plaque-Morphologie zu gewährleisten und zum anderen um geringlumige bzw. stark stenosierte Gefäße ebenfalls erreichen zu können. Die hieraus resultierenden Informationen über die Plaquezusammensetzung wären richtungsweisend für den einzuschlagenden Therapieweg.

Aber nicht nur die Anwendung solcher Sondentechnologien im vaskulären Bereich ist vorstellbar. Die Schwingungsspektroskopie scheint eine Vielzahl von Türen zu öffnen, welche für die Diagnostik bestimmter Krankheitsbilder bzw. bei der intraoperativen Entscheidungsfindung von enormer Bedeutung sein können.

8 LITERATURVERZEICHNIS

Adams CW, Miller NE, Morgan RS et al. Lipoprotein levels and tissue lipids in fatty-fibrous atherosclerosis induced in rabbits by two years' cholesterol feeding at a low level. *Atherosclerosis* 1982; 44:1-8.

Aikawa M, Rabkin E, Okada Y et al. Lipid lowering by diet reduces matrix metalloproteinase activity and increases collagen content of rabbit atheroma: a potential mechanism of lesion stabilization. *Circulation* 1998; 97:2433-44.

Beleites C, Geiger K, Kirsch M et al. Raman spectroscopic grading of astrocytoma tissues: using soft reference information. *Anal Bioanal Chem* 2011; 400:2801-16.

Beleites C, Sergo V. 2012. HyperSpec: a package to handle hyperspectral data sets in R. URL <http://hyperspec.r-forge.r-project.org/index.html> (Stand: 15.11.2013)

Bengtsson H, Riedy J. 2011. Read and write of MAT files together with R-to-Matlab connectivity R.matlab. R package version 2.0.5.

URL <http://CRAN.R-project.org/package=R.matlab> (Stand: 15.11.2013)

Bertrand M E, King S B. Hrsg. 2006. *Acute Coronary Syndromes: A Handbook for Clinical Practice*. Oxford: Blackwell Publishing, 271.

Biller K, de Lourdes Stiegeler M. Hrsg. 2008. *Wörterbuch der Logotherapie und Existenzanalyse von Viktor Emil Frankl*. Weimar: Böhlau, 738-741.

Buschman HP, Deinum G, Motz JT et al. Raman microspectroscopy of human coronary atherosclerosis: biochemical assessment of cellular and extracellular morphologic structures in situ. *Cardiovasc Pathol* 2001a; 10:69-82.

Buschman HP, Motz JT, Deinum G et al. Diagnosis of human coronary atherosclerosis by morphology-based Raman spectroscopy. *Cardiovasc Pathol* 2001b; 10:59-68.

Cicchi R, Matthäus C, Meyer T et al. Characterization of collagen and cholesterol deposition in atherosclerotic arterial tissue using non-linear microscopy. *J Biophotonics* 2013.

Colley CS, Kazarian SG, Weinberg PD et al. Spectroscopic imaging of arteries and atherosclerotic plaques. *Biopolymers* 2004; 74:328-35.

de Groot E, van Leuven SI, Duivenvoorden R et al. Measurement of carotid intima-media thickness to assess progression and regression of atherosclerosis. *Nat Clin Pract Cardiovasc Med* 2008; 5:280-8.

Dreissig I, Machill S, Salzer R et al. Quantification of brain lipids by FTIR spectroscopy and partial least squares regression. *Spectrochim Acta A Mol Biomol Spectrosc* 2009; 71:2069-75.

Drexler W, Morgner U, Ghanta RK et al. Ultrahigh-resolution ophthalmic optical coherence tomography. *Nat Med* 2001; 7:502-7.

Falk E, Shah PK. The SHAPE guideline: ahead of its time or just in time? *Curr Atheroscler Rep* 2011; 13:345-52.

Fan J, Shimoyamada H, Sun H et al. Transgenic rabbits expressing human apolipoprotein(a) develop more extensive atherosclerotic lesions in response to a cholesterol-rich diet. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2001; 21:88-94.

García-García HM, Gogas BD, Serruys PW et al. IVUS-based imaging modalities for tissue characterization: similarities and differences. *Int J Cardiovasc Imaging* 2011; 27:215-24.

Glass CK, Witztum JL. Atherosclerosis. the road ahead. *Cell* 2001; 104:503-16.

Gogas BD, Farooq V, Serruys PW et al. Assessment of coronary atherosclerosis by IVUS and IVUS-based imaging modalities: progression and regression studies, tissue composition and beyond. *Int J Cardiovasc Imaging* 2011; 27:225-37.

Hafiane A, Genest J. HDL, Atherosclerosis, and Emerging Therapies. *Cholesterol* 2013; 2013:891403.

Haka AS, Kramer JR, Dasari RR et al. Mechanism of ceroid formation in atherosclerotic plaque: in situ studies using a combination of Raman and fluorescence spectroscopy. *J Biomed Opt* 2011; 16:011011.

Hansson GK. Inflammation, atherosclerosis, and coronary artery disease. *N Engl J Med* 2005; 352:1685-95.

Hansson GK. Inflammatory mechanisms in atherosclerosis. *J Thromb Haemost* 2009; 7 Suppl 1:328-31.

Hedegaard M, Matthäus C, Hassing S, Krafft C, Diem M, Popp J. 2011. Spectral unmixing and clustering algorithms for assessment of single cells by Raman microscopic imaging. In: Jalkanen K J, Hrsg. *Theoretical Chemistry Accounts-Theory, Computation, and Modeling*. Berlin, Heidelberg: Springer, 1249–1260.

Huisman J, Hartmann M, von Birgelen C. Ultrasound and light: friend or foe? On the role of intravascular ultrasound in the era of optical coherence tomography. *Int J Cardiovasc Imaging* 2011; 27:209-14.

Insull W, Bartsch GE. Cholesterol, triglyceride, and phospholipid content of intima, media, and atherosclerotic fatty streak in human thoracic aorta. *J Clin Invest* 1966; 45:513-23.

Katz SS, Shipley GG, Small DM. Physical chemistry of the lipids of human atherosclerotic lesions. Demonstration of a lesion intermediate between fatty streaks and advanced plaques. *J Clin Invest* 1976; 58:200-11.

Kellner-Weibel G, Yancey PG, Jerome WG et al. Crystallization of free cholesterol in model macrophage foam cells. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 1999; 19:1891-8.

Kochan K, Marzec KM, Chruszcz-Lipska K et al. Pathological changes in the biochemical profile of the liver in atherosclerosis and diabetes assessed by Raman spectroscopy. *Analyst* 2013; 138:3885-90.

Kovarnik T, Kral A, Skalicka H et al. Prediction of coronary vessel involvement on the basis of atherosclerosis risk factor analysis. *Bratisl Lek Listy* 2013; 114:413-7.

Krafft C, Codrich D, Pelizzo G et al. Raman and FTIR microscopic imaging of colon tissue: a comparative study. *J Biophotonics* 2008; 1:154-69.

Krafft C, Neudert L, Simat T et al. Near infrared Raman spectra of human brain lipids. *Spectrochim Acta A Mol Biomol Spectrosc* 2005; 61:1529-35.

Krafft C, Steiner G, Beleites C et al. Disease recognition by infrared and Raman spectroscopy. *J Biophotonics* 2009; 2:13-28.

Lattermann A, Matthäus C, Bergner N et al. Characterization of atherosclerotic plaque depositions by Raman and FTIR imaging. *J Biophotonics* 2013; 6:110-21.

Li N. CD4⁺ T cells in atherosclerosis: regulation by platelets. *Thromb Haemost* 2013; 109:980-90.

Libby P, Ridker PM, Hansson GK et al. Inflammation in atherosclerosis: from pathophysiology to practice. *J Am Coll Cardiol* 2009; 54:2129-38.

Libby P, Schoenbeck U, Mach F et al. Current concepts in cardiovascular pathology: the role of LDL cholesterol in plaque rupture and stabilization. *Am J Med* 1998; 104:14S-8S.

Manoharan R, Baraga JJ, Rava RP et al. Biochemical analysis and mapping of atherosclerotic human artery using FT-IR microspectroscopy. *Atherosclerosis* 1993; 103:181-93.

Marcu L, Jo JA, Fang Q et al. Detection of rupture-prone atherosclerotic plaques by time-resolved laser-induced fluorescence spectroscopy. *Atherosclerosis* 2009; 204:156-64.

Matthäus C, Bergner G, Krafft C, Dietzek B, Romeike B F M, Brehm B R, Popp. 2011. Characterization of Atherosclerotic Plaque-Depositions by Infrared, Raman and CARS Microscopy. [Proceedings] SPIE 8087, 80871D.

Matthäus C, Cicchi R, Dochow S et al. Characterization of Atherosclerotic Plaque Depositions in vivo by Fiber-Optic Raman Spectroscopy and ex vivo by FTIR, Raman and Non-Linear Imaging Techniques. *Biomed Tech (Berl)* 2012a.

Matthäus C, Dochow S, Bergner G et al. In vivo characterization of atherosclerotic plaque depositions by Raman-probe spectroscopy and in vitro coherent anti-stokes Raman scattering microscopic imaging on a rabbit model. *Anal Chem* 2012b; 84:7845-51.

Miljković M, Chernenko T, Romeo MJ et al. Label-free imaging of human cells: algorithms for image reconstruction of Raman hyperspectral datasets. *Analyst* 2010; 135:2002-13.

Mukhin DN, Orekhov AN, Andreeva ER et al. Lipids in cells of atherosclerotic and uninvolved human aorta. III. Lipid distribution in intimal sublayers. *Exp Mol Pathol* 1991; 54:22-30.

Naghavi M, Libby P, Falk E et al. From vulnerable plaque to vulnerable patient: a call for new definitions and risk assessment strategies: Part II. *Circulation* 2003a; 108:1772-8.

Naghavi M, Libby P, Falk E et al. From vulnerable plaque to vulnerable patient: a call for new definitions and risk assessment strategies: Part I. *Circulation* 2003b; 108:1664-72.

Nogueira GV, Silveira L, Martin AA et al. Raman spectroscopy study of atherosclerosis in human carotid artery. *J Biomed Opt* 2005; 10:031117.

P Wrobel T, Mateuszuk L, Chlopicki S et al. Imaging of lipids in atherosclerotic lesion in aorta from ApoE/LDLR-/- mice by FT-IR spectroscopy and Hierarchical Cluster Analysis. *Analyst* 2011; 136:5247-55.

Palombo F, Shen H, Benguigui LE et al. Micro ATR-FTIR spectroscopic imaging of atherosclerosis: an investigation of the contribution of inducible nitric oxide synthase to lesion composition in ApoE-null mice. *Analyst* 2009; 134:1107-18.

Preston Mason R, Tulenko TN, Jacob RF. Direct evidence for cholesterol crystalline domains in biological membranes: role in human pathobiology. *Biochim Biophys Acta* 2003; 1610:198-207.

R Development CoreTeam. 2012. R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing. Vienna, Austria.

Rosenfeld ME, Khoo JC, Miller E et al. Macrophage-derived foam cells freshly isolated from rabbit atherosclerotic lesions degrade modified lipoproteins, promote oxidation of low-density lipoproteins, and contain oxidation-specific lipid-protein adducts. *J Clin Invest* 1991; 87:90-9.

Schaar JA, Mastik F, Regar E et al. Current diagnostic modalities for vulnerable plaque detection. *Curr Pharm Des* 2007; 13:995-1001.

Small DM. George Lyman Duff memorial lecture. Progression and regression of atherosclerotic lesions. Insights from lipid physical biochemistry. *Arteriosclerosis* 1988; 8:103-29.

Stary HC. Evolution and progression of atherosclerotic lesions in coronary arteries of children and young adults. *Arteriosclerosis* 1989; 9:119-32.

Stary HC, Blankenhorn DH, Chandler AB et al. A definition of the intima of human arteries and of its atherosclerosis-prone regions. A report from the Committee on Vascular Lesions of the Council on Arteriosclerosis, American Heart Association. *Circulation* 1992; 85:391-405.

Stary HC, Chandler AB, Dinsmore RE et al. A definition of advanced types of atherosclerotic lesions and a histological classification of atherosclerosis. A report from the Committee on Vascular Lesions of the Council on Arteriosclerosis, American Heart Association. *Circulation* 1995; 92:1355-74.

Stary HC, Chandler AB, Glagov S et al. A definition of initial, fatty streak, and intermediate lesions of atherosclerosis. A report from the Committee on Vascular Lesions of the Council on Arteriosclerosis, American Heart Association. *Circulation* 1994; 89:2462-78.

Steinberg D, Gotto AM. Preventing coronary artery disease by lowering cholesterol levels: fifty years from bench to bedside. *JAMA* 1999; 282:2043-50.

Sun P, Dwyer KM, Merz CN et al. Blood pressure, LDL cholesterol, and intima-media thickness: a test of the "response to injury" hypothesis of atherosclerosis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2000; 20:2005-10.

Sćepanović OR, Fitzmaurice M, Miller A et al. Multimodal spectroscopy detects features of vulnerable atherosclerotic plaque. *J Biomed Opt* 2011; 16:011009.

Schaefer H-E 2007. Atherosklerose- Struktur und Pathogenese. In: Schwandt P, Parhofer K, Hrsg. *Handbuch der Fettstoffwechselstörungen: Dyslipoproteinämien und Atherosclerose: Diagnostik, Therapie und Prävention*. Dritte Aufl. Stuttgart: Schattauer, 412-413.

Tosi G, Giorgini E, Rubini C et al. Vibrational spectroscopy as a supporting technique in clinical diagnosis and prognosis of atherosclerotic carotid plaques: a review. *Anal Quant Cytol Histol* 2012; 34:214-32.

Tsioufis C, Latsios G, Tsiachris D et al. Lack of correlation between coronary flow reserve and vascular remodelling in hypertensive patients without left ventricular hypertrophy: an optical coherence tomography study. *Hellenic J Cardiol* 2012; 53:426-31.

Vance D E, Vance J E, Hrsg. 2002. *Biochemistry of Lipids, Lipoproteins and Membranes*. Vierte Aufl. Heidelberg, London: Elsevier Science.

van de Poll SW, Kastelijn K, Bakker Schut TC et al. On-line detection of cholesterol and calcification by catheter based Raman spectroscopy in human atherosclerotic plaque ex vivo. *Heart* 2003; 89:1078-82.

van de Poll SW, Römer TJ, Puppels GJ et al. Imaging of atherosclerosis. Raman spectroscopy of atherosclerosis. *J Cardiovasc Risk* 2002; 9:255-61.

Weinmann P, Jouan M, Nguyen QD et al. Quantitative analysis of cholesterol and cholesteryl esters in human atherosclerotic plaques using near-infrared Raman spectroscopy. *Atherosclerosis* 1998; 140:81-8.

Wickham H. Reshaping Data with the reshape Package. *Journal of Statistical Software* 2007; 21(12):1–20.

Wrobel TP, Majzner K, Baranska M. Protein profile in vascular wall of atherosclerotic mice analyzed ex vivo using FT-IR spectroscopy. *Spectrochim Acta A Mol Biomol Spectrosc* 2012; 96:940-5.

Yanni AE. The laboratory rabbit: an animal model of atherosclerosis research. *Lab Anim* 2004; 38:246-56.

9 ANHANG

9.1 ABBILDUNGSVERZEICHNIS

Abb.1	Schematische Darstellung eines Mikroskop-gekoppelten FTIR-Spektrometers	11
Abb.2	Schematischer Aufbau eines Raman-Spektrometer-gekoppelten Mikroskops	12
Abb.3	IR- und Raman-Referenzspektren	29
Abb.4	Vergleich eines histomorphologisch und IR-mikrospektroskopisch bearbeiteten Gefäßquerschnittes	31
Abb. 5	Protein-Lipid-Verteilungsmuster nach IR-Mikrospektroskopie und Lipidfärbung eines Gefäßquerschnittes	33
Abb. 6	Protein-Lipid-Verteilungsmuster nach IR-Mikrospektroskopie und Lipidfärbung eines Intimaausschnittes	34
Abb. 7	Raman-spektroskopisch bearbeiteter Gefäßquerschnitt	35
Abb. 8	Komponentenspezifische Darstellung verschiedener Plaque-areale mittels Raman-Mikrospektroskopie	36
Abb. 9	Gegenüberstellung morphometrisch und spektroskopisch ermittelter Querschnittsflächen	38
Abb. 10	Vergleich zwischen morphometrisch gemessener IMR und VCA basierter LPR	39

9.2 PUBLIKATIONEN/ KONGRESSBEITRÄGE

Lattermann A, Matthäus C, Bergner N, Beleites C, Romeike BF, Krafft C, Brehm BR, Popp J. 2013. Characterization of atherosclerotic plaque depositions by Raman and FTIR imaging. J Biophotonics. 2013 Jan;6(1):110-21

Cicchi R, Matthäus C, Meyer T, **Lattermann A**, Dietzek B, Brehm BR, Popp J, Pavone FS. 2013. Characterization of collagen and cholesterol deposition in atherosclerotic arterial tissue using non-linear microscopy. J Biophotonics. 2013 Jul 17.

Matthäus C, Cicchi R, Dochow S, Krafft C, **Lattermann A**, Brehm BR, Pavone F, Popp J. 2012. Characterization of Atherosclerotic Plaque Depositions in vivo by Fiber-Optic Raman Spectroscopy and ex vivo by FTIR, Raman and Non-Linear Imaging Techniques. Biomed Tech (Berl). 2012 Aug 30.

Matthäus C, Dochow S, Bergner G, **Lattermann A**, Romeike BF, Marple ET, Krafft C, Dietzek B, Brehm BR, Popp J. 2012. In vivo characterization of atherosclerotic plaque depositions by Raman-probe spectroscopy and in vitro coherent anti-stokes Raman scattering microscopic imaging on a rabbit model. Anal Chem. 2012 Sep 18;84(18):7845-51

Poster

Lattermann A, Matthäus C, Bergner N, Beleites C, Romeike BF, Krafft C, Brehm BR, Popp J. 2012. Infrarot-Absorptions- und Raman-Mikroskopie als bildgebende Techniken zur Analyse arteriosklerotischer Plaques.

Prämiert mit dem Eberhard-Betz-Preis für das beste Poster i. R. der 26. Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Arterioskleroseforschung 2012

Dresden, den 02. September 2014

Annika Lattermann

9.3 DANKSAGUNG

Mein besonderer Dank gilt Herrn Prof. Dr. Bernhard Brehm, welcher mir die vorliegende Promotion ermöglichte und mich diesbezüglich auch in der Bewerbung für ein Promotionsstipendium des IZKF sehr kurzfristig unterstützte. Dankbar bin ich ebenfalls für den regen Kommunikationsprozess, welcher trotz der räumlichen Entfernung, nach Antritt seiner kardiologischen Chefarztstelle am Katholischen Klinikum in Koblenz, erhalten blieb.

Ebenfalls möchte ich mich bei Herrn Prof. Dr. Jürgen Popp, dem Leiter des Instituts für Photonische Technologien Jena, für die Aufnahme in eine der hier bestehenden Arbeitsgruppen bedanken. Die freundliche und kollegiale Atmosphäre hat meine Arbeit am IPHT sehr angenehm gestaltet und die Zeit wie im Flug vergehen lassen. Monate, die mich sowohl wissenschaftlich als auch in der persönlichen Entwicklung sehr geprägt haben.

Herrn Dr. Christian Matthäus gilt hierbei mein besonderer Dank zugesprochen, da er mir während der kompletten Zeit immer mit Rat und Tat zur Seite stand und durch zahlreiche Gespräche, konstruktive Diskussionen sowie aufbauende Worte zum Erfolg dieser Arbeit entsprechend beigetragen hat.

Weiterhin danke ich PD Dr. Christoph Krafft, PD Dr. Bernd Romeike, Dr. Norbert Bergner, Dr. Claudia Beleites und Dr. Sebastian Dochow für die konstruktiven Ideen und Ratschläge sowie die mir entgegengebrachte Unterstützung, welche letztendlich auch zum Gelingen der vorliegenden Arbeit beigetragen haben.

Größter Dank gebührt meinen Eltern, welche mich während meines gesamten Entwicklungsprozesses bestmöglich unterstützt haben und mir uneingeschränkt zur Seite standen. Ohne sie würde ich heute nicht an dieser Stelle stehen.

Abschließend möchte ich mich bei Herrn Tobias Lohn für seine pausenlos motivierenden und konstruktiven Worte und Hinweise hinsichtlich meiner Promotionsarbeit ganz herzlich bedanken.

9.4 EHRENWÖRTLICHE ERKLÄRUNG

Hiermit erkläre ich, dass mir die Promotionsordnung der Medizinischen Fakultät der Friedrich-Schiller-Universität bekannt ist,

ich die Dissertation selbst angefertigt habe und alle von mir benutzten Hilfsmittel, persönlichen Mitteilungen und Quellen in meiner Arbeit angegeben sind,

mich folgende Personen bei der Auswahl und Auswertung des Materials sowie bei der Herstellung des Manuskripts unterstützt haben: Prof. Dr. B. Brehm, Prof. Dr. J. Popp, PD Dr. C. Krafft, Dr. C. Matthäus, PD Dr. B. Romeike, Dr. N. Bergner, Dr. C. Beleites und Dr. S. Dochow,

die Hilfe eines Promotionsberaters nicht in Anspruch genommen wurde und das Dritte weder unmittelbar noch mittelbar geldwerte Leistungen von mir für Arbeiten erhalten haben, die im Zusammenhang mit dem Inhalt der vorgelegten Dissertation stehen,

dass ich die Dissertation noch nicht als Prüfungsleistung für eine staatliche oder andere wissenschaftliche Prüfung eingereicht habe und

dass ich die gleiche, eine in wesentlichen Teilen ähnliche oder eine andere Abhandlung nicht bei einer anderen Hochschule als Dissertation eingereicht habe.

Dresden, den 02. September 2014

Annika Lattermann